

LUCIANA DE SOUZA MADEIRA FERREIRA BOY

MONOGRAFIA

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTES DE ESTABILIDADE DE
MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM MICROBIOLOGIA

UFMG

2013

UFMG

LADO

LUCIANA DE
SOUZA
MADEIRA
FERREIRA BOY

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTES DE
ESTABILIDADE DE MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS EM
MICROBIOLOGIA**

LUCIANA DE SOUZA MADEIRA FERREIRA BOY

Belo Horizonte

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTES DE
ESTABILIDADE DOS MEIOS MICROBIOLÓGICOS DE CULTURA
ÁGAR SABOURAUD E ÁGAR MACCONKEY**

LUCIANA DE SOUZA MADEIRA FERREIRA BOY

**Monografia a ser apresentada à
Especialização em Microbiologia
do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais,
desenvolvido sob a orientação da
Profa. Regina Maria Nardi
Drummond e coorientação Maria
Aparecida Galvão.**

Belo Horizonte

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta Monografia a minha mãe, Marlucia de Souza Madeira, que desde a minha infância tem dado grande incentivo ao meu desenvolvimento intelectual. Sem você eu não teria compreendido a importância do SABER. Ao meu Amor, Fabio Luiz Boy, que me apoiou na busca de mais conhecimento nesta etapa de especialização.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

AGRADECIMENTOS

Á minha orientadora, Regina Nardi Drummond, no desenvolvimento da escrita da presente monografia. Sem a sua ajuda este trabalho teria sido muito mais árduo. À minha coorientadora e eterna chefe, Maria Aparecida Galvão, que contribuiu com a decisão do tema, desenvolvimento e elaboração do projeto e realização dos experimentos e também aos meus amigos da especialização e da FUNED, pois sem o apoio e a troca de ideias com vocês esta monografia não seria mesma.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

SUMÁRIO

Lista de tabelas	v
Lista de apêndices	ix
Resumo	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivo específico	7
3. Material e Método	8
3.1 Elaboração do protocolo de estudo de estabilidade para meios de cultura.....	8
3.2 Preparo dos lotes testes contendo os meios de culturas em placa de Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey.....	8
3.3 Planos de Estudo de Estabilidade.....	9
3.3.1 Plano de estudo para TEMPO ZERO.....	10
3.3.2 Plano de estudo para ESTABILIDADE ACELERADA.....	10
3.3.3 Plano de estudo para CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	11
3.4 Critérios de Aceitação.....	11
3.4.1 Análise da identificação e registros do produto.....	11
3.4.2 Aspectos físico-químicos.....	12
3.4.2.1 Aspecto físico	12
3.4.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	12

3.4.2.3 Aspecto da desidratação	13
3.4.3 Aspecto microbiológico.....	14
3.4.3.1 Promoção de crescimento	14
3.4.3.2 Teste de Esterilidade.....	17
4. Resultados.....	18
4.1 Ágar MacConkey.....	18
4.1.1 TEMPO ZERO.....	18
4.1.1.1 Análise da identificação e registros do produto.....	18
4.1.1.2 Aspectos físico-químicos.....	18
4.1.1.2.1 Aspecto físico	18
4.1.1.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	18
4.1.1.2.3 Aspecto da desidratação	19
4.1.1.3 Aspecto microbiológico.....	19
4.1.1.3.1 Promoção de crescimento	19
4.1.1.3.1.1 Controle da diluição.....	19
4.1.1.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	20
4.1.1.3.2 Teste de Esterilidade.....	21
4.1.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	21
4.1.2.1 Análise da identificação e registros do produto.....	21
4.1.2.2 Aspectos físico-químicos.....	21
4.1.2.2.1 Aspecto físico	21
4.1.2.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	21
4.1.2.2.3 Aspecto da desidratação	22
4.1.2.3 Aspecto microbiológico.....	24
4.1.2.3.1 Promoção de crescimento	24
4.1.2.3.1.1 Controle da diluição.....	24
4.1.2.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	25
4.1.2.3.2 Teste de Esterilidade.....	26
4.1.3 CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	26
4.1.3.1 Análise da identificação e registros do produto.....	26
4.1.3.2 Aspectos físico-químicos.....	26

4.1.3.2.1 Aspecto físico	26
4.1.3.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	27
4.1.3.2.3 Aspecto da desidratação	27
4.1.3.3 Aspecto microbiológico.....	29
4.1.3.3.1 Promoção de crescimento	29
4.1.3.3.1.1 Controle da diluição.....	29
4.1.3.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	29
4.1.3.3.2 Teste de Esterilidade.....	30
4.2 Ágar Sabouraud.....	31
4.2.1 TEMPO ZERO.....	31
4.2.1.1 Análise da identificação e registros do produto.....	31
4.2.1.2 Aspectos físico-químicos.....	31
4.2.1.2.1 Aspecto físico	31
4.2.1.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	31
4.2.1.2.3 Aspecto da desidratação	32
4.2.1.3 Aspecto microbiológico.....	32
4.2.1.3.1 Promoção de crescimento	32
4.2.1.3.1.1 Controle da diluição.....	32
4.2.1.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	33
4.2.1.3.2 Teste de Esterilidade.....	33
4.2.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	34
4.2.2.1 Análise da identificação e registros do produto.....	34
4.2.2.2 Aspectos físico-químicos.....	34
4.2.2.2.1 Aspecto físico	34
4.2.2.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	34
4.2.2.2.3 Aspecto da desidratação	35
4.2.2.3 Aspecto microbiológico.....	38
4.2.2.3.1 Promoção de crescimento	38
4.2.2.3.1.1 Controle da diluição.....	38
4.2.2.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	39

4.2.2.3.2 Teste de Esterilidade.....	39
4.2.3 CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	40
4.2.3.1 Análise da identificação e registros do produto.....	40
4.2.3.2 Aspectos físico-químicos.....	40
4.2.3.2.1 Aspecto físico	40
4.2.3.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura.....	40
4.2.3.2.3 Aspecto da desidratação	41
4.2.3.3 Aspecto microbiológico.....	42
4.2.3.3.1 Promoção de crescimento	42
4.2.3.3.1.1 Controle da diluição.....	42
4.2.3.3.1.2 Teste de Promoção de crescimento.....	43
4.2.3.3.2 Teste de Esterilidade.....	43
5. Discussão.....	44
6. Conclusão	48
7. Considerações finais.....	49
8. Referências bibliográficas.....	50
9. Apêndice.....	51

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 Cepas padrão utilizadas na determinação da promoção do crescimento microbiano do meio A. Mac.....	14
TABELA 02 Cepas padrão utilizadas na determinação da promoção do crescimento microbiano do meio A. SDA.....	14
TABELA 03 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no TEMPO ZERO.....	19
TABELA 04 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no TEMPO ZERO.....	20
TABELA 05 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey, inoculadas até 24 horas após o preparo.....	20
TABELA 06 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	22
TABELA 07 Peso e perda de água do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.....	22

TABELA 08 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.....	23
TABELA 09 Critério de Grubbs para identificação de <i>outlier</i> , nos valores da perda de água do meio Ágar MacConkey em placa no Estudo de Estabilidade Acelerada.....	23
TABELA 10 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias, após a retirada do <i>outlier</i>	24
TABELA 11 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	25
TABELA 12 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey.....	25
TABELA 13 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no estudo de CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	27
TABELA 14 Peso e perda de água do meio ágar MacConkey em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.....	28
TABELA 15 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.....	28
TABELA 16 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	29
TABELA 17 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey.....	30

TABELA 18 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no TEMPO ZERO.....	32
TABELA 19 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no TEMPO ZERO.....	33
TABELA 20 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud, inoculadas até 24 horas após o preparo.....	33
TABELA 21 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	35
TABELA 22 Peso e perda de água do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.....	35
TABELA 23 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.....	36
TABELA 24 Critério de Grubbs para identificação de <i>outlier</i> , nos valores da perda de água do meio Ágar Sabouraud em placa no Estudo de Estabilidade Acelerada.....	37
TABELA 25 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias, após a retirada do <i>outlier</i>	38
TABELA 26 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	39

TABELA 27 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud.....	39
TABELA 28 Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no estudo de CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	41
TABELA 29 Peso e perda de água do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.....	41
TABELA 30 Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.....	42
TABELA 31 Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.....	43
TABELA 32 Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud.....	43

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE 1- Protocolo para estudo de estabilidade de meios de cultura.....51

APÊNDICE 2- Fichas de produção e controle visual dos meios de cultura Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey.....63

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

RESUMO

Laboratórios de microbiologia devem utilizar meios de cultura com estabilidade assegurada para a realização das análises. O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Apesar de ser um requisito da Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998 do Ministério da Saúde, que trata das Boas Práticas de Fabricação para produto para diagnóstico de uso “*in vitro*”, ainda não existem legislações que esclareçam a metodologia para o desenvolvimento do estudo de estabilidade para produtos de diagnóstico “*in vitro*” como os meios de cultura. Dessa forma foram determinados parâmetros físico-químicos e microbiológicos, a partir de adaptações dos guias para estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos, a fim de realizar estudos de estabilidade nos meios de cultura Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey, em três condições definidas. No TEMPO ZERO a realização dos testes para as análises das unidades, incluindo a análise visual do meio de cultura, foi no tempo máximo de 24 horas após o seu preparo. No ESTUDO ESTABILIDADE ACELERADO a realização dos testes foi após as unidades terem sido expostas a condições extremas de incubação. Para a VERIFICAÇÃO DA VALIDADE, os testes foram realizados após as unidades terem sido expostas às condições ideais e terem atingido o tempo de validade estabelecido pela UHPMC. O objetivo deste trabalho foi elaborar um protocolo de padronização dos testes de estabilidade de meios de cultura utilizados no diagnóstico microbiológico e testar sua eficiência sobre diferentes meios de cultura em placa. O protocolo mostrou-se adequado para o alcance dos objetivos propostos, sendo possível analisar a performance do meio de cultura sólido em placa de Petri sobre vários parâmetros e confirmar a data de validade para os meios utilizados no estudo.

Palavras Chave: Controle de qualidade, estabilidade, meio de cultura, prazo de validade, microbiologia.

1. INTRODUÇÃO

As análises microbiológicas devem produzir resultados confiáveis baseados em metodologias oficiais ou validadas uma vez que muitas decisões importantes são diariamente tomadas na área da saúde sustentadas nos resultados obtidos nas análises laboratoriais. Para alcançar esses resultados tem sido cada vez mais necessário o desenvolvimento de protocolos de avaliação de desempenho dos métodos propostos.

De acordo com Konemen, E.W. Trad. Cury, A.E

[...] Após o recebimento de uma amostra para cultivo no laboratório de microbiologia, devem ser tomadas as seguintes decisões-chave para isolar e identificar os micro-organismos que podem estar presentes: selecionar os meios de cultura primários apropriados para o tipo de amostra; determinar a temperatura e a atmosfera de incubação para isolar todos os micro-organismos potencialmente significativos; determinar qual dos micro-organismos isolados em meios primários requer uma maior caracterização; determinar se são necessárias provas de suscetibilidade a antibióticos, uma vez conhecida a identidade do micro-organismo [...].¹

Neste contexto, o diagnóstico microbiológico está intimamente ligado a qualidade dos meios de cultura utilizados, que por sua vez torna-se um dos principais componentes que influencia na repetitividade e reprodutibilidade das análises. O que faz desse produto uma das principais incertezas que incidem sobre os resultados obtidos.

Conforme Madigan, M.T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P.

Meios de cultura correspondem as soluções nutrientes utilizadas para promover o crescimento de micro-organismos em laboratório.²

Quanto a composição química os meios de cultura são divididos em duas classes: quimicamente definidos, cuja composição química é exata e conhecida e meios complexos quando não se pode afirmar com precisão a composição nutricional. Apresentam-se como líquidos, sólidos (1,3 a 1,5% de ágar) e semi-sólidos (0,4 a 0,6% de ágar).²

Quanto a finalidade os meios são classificados em: meios de cultura para o transporte e conservação, crescimento e isolamento além de provas de identificação de micro-organismos³. A escolha adequada do meio de cultura para uso pode ser decisiva nos diagnósticos e na identificação de uma variedade de patógenos relacionados às enfermidades que acometem humanos e animais.

Entre as várias centenas de meios de cultura comercialmente disponíveis, além das numerosas formulações “pessoais” divulgadas na literatura médica, é necessário apenas um pequeno número para uso diário. Em geral são utilizadas placas de ágar.¹

Os meios podem ser seletivos ou não-seletivos. Os não-seletivos são isentos de inibidores e permitem o crescimento de muitos micro-organismos. O ágar Sabouraud, é um meio não-seletivo utilizado para a pesquisa de fungos (filamentosos ou leveduriformes).⁴ Pode-se tornar o ágar sabouraud seletivo mediante a adição de antibiótico.

O ágar MacConkey é o meio de cultura seletivo utilizado para inibir micro-organismos gram-positivos, os sais biliares e o cristal violeta são os inibidores presentes na composição do meio.¹ Além disso o meio é classificado ainda como diferencial pois diferencia os micro-organismos quanto a fermentação da lactose.⁴

Pelo fato do cultivo em laboratório ser requerida para o estudo detalhado de um micro-organismo, é necessária atenção criteriosa na seleção e no preparo dos meios para que o cultivo seja bem sucedido.²

Para a reconstituição dos meios de cultura desidratados é necessário conferir as instruções completas para o preparo do meio dadas no rótulo de cada frasco e/ou manuais.⁶ Alguns pontos críticos que devem ser considerados para o processo produtivo são: armazenamento do insumo desidratado, a qualidade da água, a qualificação de equipamentos, a calibração de dispositivos de medição e ensaio, de treinamento, conscientização e competência da equipe técnica, a área produtiva adequada às necessidades, controle de qualidade com múltiplas cepas padrão de referência, documentação de produção e retenção de amostras para testes futuros.

A monitorização das etapas de produção garantem a obtenção de produto com qualidade que envolve a formulação, pesagem, hidratação, medição do pH preparo, aquecimento e homogeneização, esterilização, identificação com o nome, data de fabricação, data de validade e tipo de armazenamento e distribuição.³

Para a maioria dos meios de cultura a etapa de esterilização é realizada utilizando o equipamento autoclave com temperatura de 121°C e pressão controlada^{3,6}. A esterilização por filtração é realizada com filtro de porosidade de 0,22micra, recomendado para remoção de células bacterianas.³

Uma vez preparado e antes do uso, amostras do lote de meio de cultura devem ser submetidas a controles de qualidade. Lote é uma quantidade definida de um produto

terminado obtido em um único processo ou série de processos, cujas características essenciais são a homogeneidade e quantidade dentro dos limites especificados.⁹

Vários são os parâmetros analisados durante o controle de qualidade, como por exemplo, análise das características organolépticas, pH final, promoção de crescimento e esterilidade.

As características organolépticas como cor, gelificação e homogeneidade devem ser analisadas visualmente, unidade por unidade, pois qualquer alteração identificada sinaliza que o meio pode estar impróprio ou então podem ser alterações pontuais que não comprometem todo o lote. Alterações pontuais ocorrem uma vez que o preparo e distribuição de meios de cultura, em sua maioria são realizados manualmente. Cabe ressaltar que muitas das mudanças de coloração, por exemplo, podem indicar alteração de pH, isso pode ser detectado visualmente antes mesmo da utilização de equipamentos phmetros.⁶

Durante a análise visual pode ser identificados pontos de precipitação ou ainda geleificação insatisfatória. Algumas das causas prováveis para a precipitação do meio podem ser a qualidade inadequada da água, sujidade nos frascos utilizados para o preparo do meio, superaquecimento do meio ou dissolução incompleta ou até mesmo valor incorreto de pH⁶. A gelificação insatisfatória tem como algumas das causas prováveis a hidratação ou pesagem errada, qualidade inadequada da água ou dos frascos utilizados para o preparo do meio ou superaquecimento do meio ou dissolução incompleta.⁶

A manutenção prolongada do ágar a temperatura de 50°C, antes do plaqueamento, provoca alterações do tipo precipitação ou gelificação insatisfatório e detecção de pH final errado. Desta forma, o recomendado é a manutenção do meio de cultura nessa temperatura por no máximo 3 horas.⁶

É importante que o pH de um meio de cultura esteja próximo do ideal para o crescimento dos micro-organismos em estudo. Os agentes tamponantes como, por exemplo, fosfatos, acetatos, citratos podem fazer parte da formulação dos meios de cultura e contribui para a manutenção e estabilização do pH.

A detecção de pH final errado tem como outras causas prováveis a determinação do valor do pH em temperatura acima de 25° C, superaquecimento devido a esterilização prolongada, liquefação do meio após a solidificação; dissolução incompleta do meio de cultura; qualidade inadequada da água ou dos frascos; meio desidratado armazenado incorretamente ou com prazo de validade expirado.⁶

A disponibilidade de água esta diretamente relacionada com o crescimento dos micro-organismos seja em ambientes naturais ou em meios de cultura, uma vez que a maioria dos nutrientes disponíveis é solúvel em meio aquoso. A pesagem e análise da perda de peso das placas indica a perda de água no meio de cultura pronta. A perda da umidade de placas com ágar é causa rotineira de falha no desempenho microbiológico.⁶

O teste de promoção de crescimento é importante para a análise de alterações no crescimento bacteriano sendo parcial ou inibido, sem a presença de agente seletivo, tem como causas prováveis o aquecimento prolongado e excessivo, dissolução incompleta dos constituintes do meio, presença de substâncias inibitórias na água ou frascos ou pH alterado⁶. A degradação química como oxidação ou perda da atividade microbiana, pode ser retardada através de proteção contra luz, calor e desidratação.⁵

É importante garantir a esterilidade do meio de cultura preparado, uma contaminação pode gerar resultados falso positivos ou até mesmo inibir o crescimento do micro-organismo pesquisado em determinada amostra. A ausência de micro-organismo em todos os meios incubados durante o período determinado no teste de esterilidade é fundamental para a garantia da qualidade do meio.

De acordo com o Manual de Acreditação para Laboratórios de Microbiologia

[...] os meios preparados devem ser verificados com relação à sobrevivência ou recuperação dos micro-organismos alvo; inibição ou supressão dos micro-organismos não alvo; propriedades bioquímicas (diferenciais e diagnósticas); propriedades físicas (por exemplo: pH, volume e esterilidade) e o prazo de validade dos meios preparados e mantidos nas condições definidas de armazenamento, deve ser determinado e controlado [...].⁸

Prazo de validade é a data limite para a utilização de um produto definido pelo fabricante, com base nos seus respectivos testes de estabilidade, mantidas as condições de armazenamento e transporte estabelecidos. Teste de estabilidade é o conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de estocagem determinadas⁹.

Os laboratórios de microbiologia devem utilizar meios de cultura com estabilidade assegurada para a realização dos ensaios. A estabilidade dos meios de cultura é um requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Pelo perfil de estabilidade de um produto é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia dentro de seu prazo de validade.

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar e alterar a estabilidade do produto¹⁰.

As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos qual o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e vibração) e intrínseco, relacionado à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento: incompatibilidade física e incompatibilidade química, como, por exemplo, pH, reações de óxido-redução e reações de hidrólise.¹¹

Durante todo estudo de estabilidade as amostras em teste devem permanecer armazenadas nas embalagens primárias (embalagem que está em contato direto com o produto e que pode se constituir em recipiente ou envoltório destinado a enxaguar ou manter, cobrir ou empacotar matérias-primas, produtos semi-elaborados ou produtos acabados) e secundárias (embalagem que não entra em contato direto com o produto e que pode se constituir em recipiente ou envoltório destinado a acondicionar o produto acabado) originais.⁸

Apesar de ser um requisito da Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998 do Ministério da Saúde, que trata das Boas Práticas de Fabricação para produto para diagnóstico de uso “*in vitro*”, ainda não existe legislações que esclareçam a metodologia para o desenvolvimento do estudo de estabilidade para produtos de diagnóstico “*in vitro*” como os meios de cultura.

De acordo com Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998 do Ministério da Saúde

[...] deve ser estabelecido um programa escrito de ensaios de estabilidade para os produtos acabados. Devem ser seguidos planos e métodos analíticos indicadores de estabilidade. As amostras dos produtos submetidos ao estudo de estabilidade devem ser armazenadas na embalagem original como as usadas para sua comercialização, à temperatura ambiente ou na temperatura recomendada para sua conservação e também em condições que acelerem o seu envelhecimento [...].

13

Atualmente, existem resoluções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe de guias para o desenvolvimento de estudo de estabilidade de produtos

farmacêuticos como por exemplo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 210 (2003) e a Nota Técnica nº 001 (2008).

Convém lembrar que, até 1984, as metodologias de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos seguiam princípios técnicos e científicos, sem interferência de atos regulatórios emitidos por agências ou órgãos de vigilância sanitária. As empresas utilizavam metodologias próprias, juntando seus dados e informações na documentação de registro.¹²

O incremento do comércio internacional, o processo de especialização de unidades produtivas e a racionalização da produção de medicamentos para atender aos princípios de produção em escala econômica, todos incluídos no contexto caracterizado como globalização, contribuíram para que fosse considerado indispensável o conhecimento do comportamento das formas farmacêuticas nas diferentes áreas do planeta.¹²

Uma vez que não foram encontradas resoluções esclarecedoras para o desenvolvimento do estudo de estabilidade para produtos de diagnóstico *in vitro*, dentre esses os meios de cultura, foram determinados os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos dos meios de cultura, a partir de adaptações dos guias para estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos, em três condições definidas neste estudo: após o preparo (tempo zero), após armazenamento em condições extremas (estudo acelerado) e após o armazenamento em condições adequadas (confirmação de validade).

O estudo em questão foi desenvolvido para atender ao requisito previsto na Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998 do Ministério da Saúde que trata das Boas Práticas de Fabricação para produto para diagnóstico de uso “*in vitro*”, além de também atender a norma NBR: ISO 17025:2005 no requisito rastreabilidade (item 5.6.2.2) para os laboratórios de ensaio.¹⁵

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um protocolo padronizado de estudo de estabilidade de meios de culturas utilizados em ensaios microbiológicos.

2.2 Objetivos específicos

Elaborar um protocolo de estudo de estabilidade para meios de cultura.

Realizar estudo de estabilidade em dois meios de cultura sólidos em placas, conforme protocolo elaborado.

Certificar os prazos de validade atualmente determinados dos meios de cultura utilizados no desenvolvimento do estudo proposto.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Elaboração do protocolo de estudo de estabilidade para meios de cultura

A metodologia adotada para a realização deste trabalho esta alicerçada na pesquisa de legislações e estudos referente ao assunto de estabilidade de produtos e visita técnica no setor de estudo de estabilidade de medicamentos da indústria farmacêutica da Fundação Ezequiel Dias.

Inicialmente realizou-se pesquisa documental envolvendo levantamento das principais legislações vigentes e normas definidas. Esta etapa teve como premissa conhecer melhor o tema para contextualizar e apresentar os principais conceitos e metodologias de estudos de estabilidade.

Posteriormente foi realizada a visita técnica no setor de desenvolvimento de estudo de estabilidade, a fim de compreender na pratica como é desenvolvido os estudos para medicamentos e buscar o que poderia se aplicado para os estudos com meios de cultura.

A partir do levantamento documental e da visita técnica foi elaborado o PROTOCOLO PARA ESTUDO DE ESTABILIDADE (APENDICE 1), com aplicação para meios de cultura sólidos (distribuídos em tubos de vidro e placas de Petri), líquidos e semissólidos. A funcionalidade desse protocolo foi testada em dois lotes de meios de cultura sólidos em placa.

3.2 Preparo dos lotes testes contendo os meios de culturas em placa de Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey

A funcionalidade deste protocolo foi avaliada utilizando meios de cultura comerciais de diferentes marcas e finalidade de uso. O meio Ágar Sabouraud (A.SDA) foi escolhido, pois proporciona o crescimento fúngico e Ágar MacConkey (A. Mac), pois proporciona o crescimento bacteriano de modo seletivo e diferencial.

O meio Ágar Sabouraud contém em sua formulação nutrientes que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos, sendo utilizado para o cultivo e crescimento de espécies de *Candida* e de fungos filamentosos, particularmente aqueles associados a infecções superficiais³. O meio é composto por dextrose 40g/L, peptonas 10g/L,

ágar 15g/L⁷. O lote para teste foi identificado pela sequencia 12081953-1 totalizando 70 placas.

O ágar MacConkey é um meio seletivo e diferencial amplamente utilizado para o isolamento de enterobactérias e outros bastonetes Gram negativos entéricos relacionados. Este meio tem como compostos seletivos o cristal violeta e os sais biliares. Estes compostos inibem o crescimento de micro-organismos Gram positivos, especialmente enterococos e estafilococos, e algumas bactérias Gram negativas exigentes. A lactose é o único carboidrato presente e o vermelho neutro é o indicador de pH do meio. A composição do meio é de peptona 20g/L, lactose 10g/L, sais biliares 5g/L, cloreto de sódio 5g/L, vermelho neutro 0,075g/L e ágar 12g/L⁶. O lote para teste foi identificado pela sequencia 12081950-2 totalizando 56 placas.

Os lotes foram preparados de acordo com as orientações dos manuais e rótulos das marcas utilizadas e foram distribuídos em placas de Petri (90x15 cm), com volume aproximado de 23 a 25 mL pelos técnicos da Unidade de Higienização e Preparo de Meios de Cultura (UHPMC) na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Entre 12-18 horas após o preparo do meio de cultura, cada lote, foi submetido à análise visual e então foram enviados para o Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) da UHPMC acompanhadas da ficha de produção do meio e o formulário de controle visual realizado e aprovado (APENDICE 2).

No LCQ as amostras recebidas foram identificadas e separadas de acordo com os planos de estudo para cada etapa que foi realizada conforme os critérios de avaliação definidos. Durante todos os estudos as unidades permaneceram armazenadas nas embalagens primárias (placas de plástico estéreis) e secundárias (sacos plásticos de primeiro uso) em que foram acondicionadas durante o preparo. Os dados referentes às unidades, teste e resultados foram registrados em formulários próprios para posterior análise.

3.3 Planos de Estudo de Estabilidade

O meio de cultura sólido em placas é armazenado em geladeira (5°C ± 3) e possui prazo de validade de 30 dias. Essa condição de armazenamento e definição de validade foi estabelecida pela UHPMC baseando-se em seu histórico e experiência de produções. As unidades separadas para os estudos foram testadas por etapas em tempos e condições

definidas. As etapas foram denominadas de Tempo Zero, Estudo Acelerado e Verificação da Validade.

As análises físico-químicas e microbiológica foram realizadas em triplicata. Sendo necessárias 18 placas de Ágar SDA para as análises de pH (3), esterilidade (3) e promoção de crescimento e 12 placas do meio A.Mac para as análises de pH (3), esterilidade (3) e promoção de crescimento (6) para cada uma das etapas do estudo.

Todos os critérios de avaliação que foram avaliados em cada estudo estão descritos no item 3.4 Critérios de avaliação.

Todos os equipamentos e soluções utilizados no estudo estavam devidamente calibrados e qualificados de acordo com as suas especificidades e também conforme previsto na norma NBR: ISO 17025:2005.¹⁵

3.3.1 Plano de estudo para TEMPO ZERO

Neste estudo todos os registros e etiquetas de identificação foram avaliados, o pH final verificado, as placas foram pesadas, incubadas para a avaliação da esterilidade e testadas com micro-organismos no tempo máximo de até 24 horas após a produção do meio.

Os resultados obtidos a partir desse estudo foram utilizados para a definição sobre o início dos testes de Estabilidade Acelerada e Confirmação da validade.

3.3.2 Plano de estudo para ESTABILIDADE ACELERADA

Neste estudo as placas foram inicialmente pesadas e então expostas a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, sugerida como extrema capaz de acelerar o envelhecimento do produto, em incubadora tipo B.O.D, durante a metade do prazo de validade estabelecido, ou seja 15 dias.

Após o período de exposição à condição extrema o pH final foi verificado, as placas foram pesadas novamente, incubadas para a avaliação da esterilidade e testadas com micro-organismos.

Os resultados obtidos a partir desse estudo foram utilizados em conjunto com o estudo no TEMPO ZERO bem como o teste da CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE, para avaliar alterações que possam interferir em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de

curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas para o produto, que podem ocorrer durante o transporte do meio de cultura, por exemplo.

3.3.3 Plano de estudo para CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE

Neste estudo as placas foram inicialmente pesadas e então armazenadas em geladeira ($5^{\circ}\text{C} \pm 3$) durante 30 dias, essas condições são estabelecidas como ideais para a preservação do produto.

Após o período de armazenamento o pH final foi verificado, as placas foram pesadas novamente, incubadas para a avaliação da esterilidade e testadas com micro-organismos.

Os resultados obtidos a partir desse estudo foram comparados com os dados no TEMPO ZERO bem como os do ESTUDO ACELERADO e estes foram utilizados para confirmar ou avaliar o prazo de validade do meio de cultura testado.

3.4 Critérios de Avaliação

Os procedimentos de avaliação do desempenho técnico dos produtos serão os seguintes:

3.4.1 Análise da identificação e registros de produção

Os registros e as etiquetas de identificação referentes ao produto em teste devem conter nome, número de lote, fabricação, validade e condições de armazenamento corretamente escritas.

Metodologia: Análise visual e técnica.

Critério de aceitabilidade: Todos os registros e identificação devem estar com as informações corretas – APROVADO;

Critério de rejeição: Falta de qualquer registro e identificação sem as informações – REPROVADO.

3.4.2 Aspectos físico-químicos

3.4.2.1 Aspecto físico

O meio de cultura deve estar livre de precipitado, estar homogêneo e com coloração de acordo com o recomendado pelo fabricante. Quando o ágar estiver presente na composição do meio de cultura desidratado a geleificação também será avaliada.

Metodologia: Análise visual

Critério de aceitabilidade: meio homogêneo, sem precipitados, geleificação boa e com a cor dentro do estabelecido pelo fabricante – APROVADO.

Critério de rejeição: presença de precipitado, geleificação insatisfatória, dissolução e homogeneização inadequada e cor fora do estabelecido pelo fabricante – REPROVADO.

3.4.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

O valor do pH final deve estar dentro do intervalo estabelecido no rótulo do meio de cultura.

Metodologia: uso de eletrodo de superfície acoplado ao potenciômetro calibrado com soluções certificadas 4,0 e 7,0.

Critério de aceitabilidade: dentro do intervalo estabelecido no rótulo – APROVADO;

Critério de rejeição: fora do intervalo estabelecido no rótulo – REPROVADO.

3.4.2.3 Aspecto da desidratação

As unidades pesadas não devem ter perda de água superior a 5% do peso inicial. Perda de água superior a 5% do peso inicial caracteriza-se a desidrataação significativa do meio de cultura, podendo comprometer assim o crescimento de micro-organismos ⁶.

Metodologia: uso de balança para a pesagem das placas durante o desenvolvimento dos estudos. A balança deve ser tarada antes das pesagens com uma placa vazia, sem meio de cultura vazia de cultura, para que o peso da placa seja desconsiderado.

Os resultados das pesagens foram apresentados em tabela e realizado tratamento estatístico para a identificação de valores discrepantes (*outliers*) de acordo com critério de Grubbs, descrito na norma ISO 5725-2 recomendado por uma norma ASTM.¹⁶

Critério de Grubb: Seguindo o primeiro critério para identificar resultados extremos em uma amostra com n observações, os passos são os seguintes:

- Passo 1: Classificar, em ordem crescente, os resultados $X_1, X_2, X_3, \dots, X_N$.
- Passo 2: Determinar G_1 (referente ao menor valor do conjunto) e G_n (referente ao maior valor) de acordo com as seguintes expressões:

$$G_1 = \frac{(\text{MÉDIA} - X_1)}{\text{DESVIO PADRÃO}} \qquad G_N = \frac{(X_N - \text{MÉDIA})}{\text{DESVIO PADRÃO}}$$

- Passo 3: Decidir com base nos valores críticos para G_2
 - para o menor valor: se $G_1 < G_{\text{tabelado}}$, o menor valor não é considerado aberrante; caso contrario, é considerado aberrante.
 - para o maior valor: se $G_n < G_{\text{tabelado}}$, o maior valor não é considerado aberrante; caso contrario, é considerado aberrante.

Critério de aceitabilidade: perda de peso das placas contendo o meio em análise for inferior a 5% – APROVADO.

Critério de rejeição: perda de peso das placas contendo o meio em análise for superior a 5% – REPROVADO.

3.4.3 Aspecto microbiológico

3.4.3.1 Promoção de crescimento

Avaliar o cultivo de micro-organismos padrão específico para cada tipo de meio de cultura determinando a seletividade e diferenciação das colônias, bem como crescimento satisfatório.

Metodologia: Diluição sucessiva partindo da escala 0,5 *Mac Farland*

Verificar a capacidade de promoção de crescimento utilizando diluições padronizadas com inóculo <100 UFC/mL de micro-organismos padrão de referência da *AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION* (ATCC), conforme descrito nas TABELAS 01 e 02:

TABELA 01 Cepas padrão utilizadas na determinação da promoção do crescimento microbiano do meio A. Mac:

Controles	Micro-organismo	ATCC	INOCULO
Controle positivo	<i>Escherichia coli</i>	8739	<100 UFC/mL
	Lactose positivo		
Controle negativo	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	<100 UFC/mL

TABELA 02 Cepas padrão utilizadas na determinação da promoção do crescimento microbiano do meio A. SDA:

Controles	Micro-organismo	ATCC	INOCULO
Controle positivo	<i>Candida albicans</i>	10231	<100 UFC/mL

A) Diluição Bacteriana

Utilizar cepas de referência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* mantidas em geladeira em tubo inclinado para realizar subculturas em placas. Com uma alça descartável,

retirar uma alíquota da cepa de referência do tubo, estriar em placa contendo meio de cultura nutritivo (ágar sangue ou ágar TSA), com o objetivo de serem obtidas colônias isoladas. Incubar por 24 horas à temperatura de 33°C a 37°C.

A partir do crescimento em placa selecionar três a quatro colônias, bem isoladas com o mesmo tipo morfotipo e com o auxílio de uma alça bacteriológica gastar as colônias na parede do tubo de hemólise estéril, contendo aproximadamente 2 a 3 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril. Agitar o tubo no agitador de tubos.

Realizar a leitura no equipamento turbidímetro, para aferição da turbidez, se necessário ajustar a turbidez da cultura utilizando o tampão, até obter uma turbidez óptica comparável a da solução 0,5 *MaC Farland* (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC / mL)¹⁴.

Em tubos contendo 9 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril, pipetar 1mL da suspensão com micro-organismos (0,5 *Mac Farland*), para o 1° tubo contendo 9 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril utilizando micropipeta de 1000µL. Realizar diluições sucessivas, de modo a obter uma suspensão que contenha entre 10-100 células viáveis.

Para verificar qual diluição atende ao parâmetro estabelecido, pipetar 0,1mL utilizando micropipeta de 100µL, das últimas diluições realizadas no meio padrão Agar TSA, espalhar com a alça de *Drigalsky* e incubar. Após a incubação proceder a contagem em placas para determinar a densidade microbiana obtida com cada diluição, afim da obtenção de inóculo <100 UFC/mL¹⁴.

B) Inoculação no meio de cultura sólido em placa (Spread plate)

Inocular em triplicata na superfície da placa 0,1 mL, utilizando micropipeta de 100µL da diluição do micro-organismo previamente preconizada contendo 10-100 células viáveis, espalhar utilizando alça de *Drigalsky* e incubar por até 24 horas a temperatura de 33°C a 37°C.

Após a incubação realizar a contagem das colônias e multiplicar o valor obtido por 10, a fim de se calcular o número de UFC/mL.

C) Diluição Fúngica

Utilizar cepas de *Candida albicans* mantidas em geladeira em tubo inclinado para realizar subculturas em tubos. Com uma alça descartável, retirar uma alçada da cepa de referência do tubo, estriar em outro tubo contendo meio de cultura nutritivo (ágar Sabouraud). Incubar à temperatura de 23°C a 27°C.

Lavar o crescimento obtido no tubo com 2 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril e transferir 1mL, utilizando micropipeta de 1000µL para frasco contendo 99mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril (suspensão estoque). Homogeneizar a suspensão manualmente. Transferir 2 a 3 mL da solução do frasco para um tubo de hemólise, agitar no agitador de tubos.

Realizar a leitura no equipamento turbidímetro, para aferição da turbidez, se necessário ajustar a turbidez da cultura utilizando o tampão, até obter uma turbidez óptica comparável a da solução 0,5 *MaC Farland* (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC / mL)¹⁴.

Em tubos contendo 9 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril, pipetar 1mL da suspensão com micro-organismos (0,5 *Mac Farland*), para o 1º tubo contendo 9 mL de solução tampão cloreto de sódio peptona pH 7,0 estéril utilizando micropipeta de 1000µL. Realizar diluições sucessivas, de modo a obter uma suspensão que contenha entre 10-100 células viáveis.

Para verificar qual diluição atende ao parâmetro estabelecido, inocular, utilizando micropipeta de 1000µL das diluições em 04 placas com meio padrão Ágar TSA, divididas da seguinte forma: 0,3mL em 3 placas e 0,1mL em 1 placa. Com o auxílio da alça de *Drigalsky* espalhar todo o conteúdo sobre a placa e incubar. Após a incubação proceder a contagem em placas para determinar a densidade microbiana obtida com cada diluição, afim da obtenção de inóculo <100 UFC/mL¹⁴.

D) Inoculação no meio de cultura sólido em placa (Spread plate)

Inocular em triplicata, na superfície, a diluição em 04 placas com meio de cultura em teste da seguinte forma: 0,3mL em 3 placas (utilizando micropipeta de 1000µL) e 0,1mL em 1 placa (utilizando micropipeta de 100µL). Com o auxílio da alça de *Drigalsky* espalhar todo o conteúdo sobre a placa. Incubar a temperatura de 23°C a 27°C por 72 horas.

Após a incubação realizar a contagem do número de colônias que se desenvolveram nos meios sólidos, que juntas deve ter um somatório entre 10-100 UFC.

Critério de aceitabilidade: respostas satisfatórias acima de 10 UFC dos meios frente aos micro-organismos. – APROVADO.

Critério de rejeição: respostas insatisfatórias (diferenciação e seletividade) e crescimento abaixo de 10 UFC nos meios de cultura frente aos micro-organismos. – REPROVADO.

3.4.3.2 Teste de Esterilidade

Verificar a esterilidade dos meios de culturas preparados.

Metodologia: As unidades separadas para esterilidade devem ser incubadas, em estufa 33°C a 37°C para o meio Á. Mac e estufa 23°C a 27°C para o meio Á. SDA por no mínimo 72 horas.

Critério de aceitabilidade: ausência de alteração e de possíveis contaminações (colônias ou turvação) - APROVADO.

Critério de rejeição: ocorrendo alteração do meio ou presença de possíveis contaminações (colônias ou turvação) - REPROVADO.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos das análises físicas, químicas e microbiológicas dos estudos para cada meio de cultura serão relatadas a seguir.

4.1 Ágar MacConkey

4.1.1 TEMPO ZERO

4.1.1.1 Análise da identificação e registros de produção

A avaliação da identificação do meio de cultura como nome, número de lote, fabricação, validade e condições de armazenamento, bem como verificação das fichas de produção e de controle visual entregues ao LCQ-UHPMC foram considerados aprovados, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.1.1.2 Aspectos físico-químicos

4.1.1.2.1 Aspecto físico

A análise das características físicas como cor, gelificação e homogeneidade foi realizada visualmente. As placas apresentaram coloração homogênea vermelha, sem precipitados, e gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.1.1.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 7,00 e atende ao intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $7,1 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 03:

TABELA 03 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no TEMPO ZERO.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	7,01
02	7,01
03	7,00
MÉDIA	7,00

4.1.1.2.3 Aspecto da desidratação

No Tempo zero não tem possibilidade de avaliar a perda de peso e consequente desidratação uma vez que os meios são testados em até 24 horas após o preparo.

4.1.1.3 Aspecto microbiológico

4.1.1.3.1 Promoção de crescimento

4.1.1.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10^{-6} , dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida está descrita na TABELA 04.

TABELA 04 - Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no TEMPO ZERO.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	70	60	70	67
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	60	60	70	63

4.1.1.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

As colônias do micro-organismo de *Escherichia coli* apresentaram-se rosas e a contagem das placas do meio Á. Mac teve resultados acima de 10UFC/placa. O crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* foi inibido nas placas do meio Á. Mac. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem das placas e a média obtida esta descrita na TABELA 05:

TABELA 05 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey, inoculadas até 24 horas após o preparo:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	50	60	60	57
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	00	00	00	-

4.1.1.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

4.1.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Todos os parâmetros avaliados no TEMPO ZERO foram repetidos nas placas que foram expostas em condições extremas, permanecendo durante 15 dias de incubação, em estufa com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

4.1.2.1 Análise da identificação e registros de produção

As identificações das etiquetas e os formulários foram confirmados nas placas separadas para o estudo. A verificação foi aprovada, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.1.2.2 Aspectos físico-químicos

4.1.2.2.1 Aspecto físico

As características organolépticas como cor, gelificação e homogeneidade foram mantidas estáveis, sem alterações visíveis. As placas estavam com coloração homogênea vermelha, sem precipitados, gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.1.2.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 6,93 e atende ao do intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $7,1 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 06:

TABELA 06 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	6,93
02	6,92
03	6,93
MÉDIA	6,92

4.1.2.2.3 Aspecto da desidratação

As placas separadas para o estudo de estabilidade acelerada foram pesadas antes e após o término do período de incubação. Os valores estão descritos na TABELA 07:

TABELA 07 – Peso e perda de água do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.

Identificação das placas de Á. Mac	Peso das unidades antes da incubação peso (g)	Peso das unidades após 15 dias incubação peso (g)	Perda de água (g)
01	48,28	47,38	0,9
02	41,85	40,39	1,46
03	40,85	36,91	3,94
04	46,08	44,30	1,78
05	39,65	38,66	0,99
06	41,89	40,96	0,93

Foram calculadas a média e o desvio padrão, e os valores foram transformados em porcentagem para facilitar a análise dos dados, conforme descrito na TABELA 08:

TABELA 08 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias .

Cálculos	Valores antes da incubação	Valores após 15 dias incubação	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	43,1 \pm 3,33	41,43 \pm 3,82	1,66 \pm 1,16
%	100,00 \pm 7,7	96,12 \pm 8,86	3,85 \pm 2,69

A perda de peso total das placas foi de $3,85 \pm 2,69$. Para verificar se existe a presença de algum dado discrepante, uma vez que o desvio padrão calculado foi alto, o *outlier* foi pesquisado de acordo com os critérios de Grubbs, conforme descrito na TABELA 09:

TABELA 09 – Critério de Grubbs para identificação de *outlier*, nos valores da perda de água do meio Ágar MacConkey em placa no Estudo de Estabilidade Acelerada

Identificação	Perda de água	G_1 / G_n	Valor G tabelado N = 6
			G tabelado 1,622*
X ₁	0,9	0,65	G ₁ < G tabelado
X ₂	0,93	0,63	G ₁ < G tabelado
X ₃	0,99	0,58	G ₁ < G tabelado
X ₄	1,46	0,17	G ₁ < G tabelado
X ₅	1,78	0,1	G _n < G tabelado
X₆	3,94	1,97	G_n > G tabelado

Foi evidenciado que os resultados da média e do desvio padrão foram distorcidos pelo valor de 1,97 encontrado na placa 03 (X₆) que apresentou-se maior do que o valor tabelado 1,622. O valor tabelado foi retirado da tabela valores crítico para G₁ e G_n dos critérios de Grubbs. Ele foi considerado um *outlier*. Uma vez identificado o *outlier* o valor foi retirado da tabela e os valores foram calculados, conforme descrito na TABELA 10:

TABELA 10 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias, após a retirada do *outlier*.

Cálculos	Valores antes da incubação	Valores após 15 dias incubação	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	43,55 \pm 3,52	42,34 \pm 3,48	1,21 \pm 0,39
%	100,00 \pm 8,08	97,22 \pm 7,99	2,77 \pm 0,89

A perda de peso total das placas foi de $2,77 \pm 0,89$, sendo inferior ao valor estabelecido de 5% que é considerado como desidratação significativa do meio de cultura⁶, dessa forma o lote foi aprovado.

4.1.2.3 Aspecto microbiológico

4.1.2.3.1 Promoção de crescimento

4.1.2.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10^{-6} , dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida esta descrita na TABELA 11.

TABELA 11 - Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	60	60	70	63
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	60	60	60	60

4.1.2.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

As colônias do micro-organismo de *Escherichia coli* apresentaram-se rosas e a contagem das placas do meio Á. Mac teve resultados acima de 10UFC/placa. O crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* foi inibido nas placas do meio Á. Mac. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem das placas e a média obtida esta descrita na TABELA 12:

TABELA 12 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	40	40	50	43
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	00	00	00	-

4.1.2.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

4.1.3 CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE

Todos os parâmetros avaliados no TEMPO ZERO e no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foram repetidos nas placas que foram mantidas nas condições ideais de armazenamento, em geladeira 2° a 8°C durante 30 dias após o preparo.

4.1.3.1 Análise da identificação e registros de produção

As identificações das etiquetas e os formulários foram confirmados nas placas separadas para o estudo. A verificação foi aprovada, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.1.3.2 Aspectos físico-químicos

4.1.3.2.1 Aspecto físico

As características organolépticas como cor, gelificação e homogeneidade foram mantidas estáveis, sem alterações visíveis. As placas estavam com coloração homogênea vermelha, sem precipitados, gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.1.3.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 6,96 e atende ao intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $7,1 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 13:

TABELA 13 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar MacConkey no estudo de CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	6,97
02	6,97
03	6,95
MÉDIA	6,96

4.1.3.2.3 Aspecto da desidratação

As placas separadas para o estudo de confirmação da validade foram pesadas antes e após o término do período de incubação. Os valores estão descritos na TABELA 14:

TABELA 14 – Peso e perda de água do meio ágar MacConkey em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.

IDENTIFICAÇÃO	Peso das unidades antes da refrigeração (g)	Peso das unidades após 30 dias de refrigeração	PERDA DE ÁGUA (g)
Placa 01	47,12	47,01	0,11
Placa 02	47,30	47,23	0,07
Placa 03	51,76	51,66	0,1
Placa 04	39,93	39,81	0,12
Placa 05	41,59	41,39	0,2
Placa 06	46,28	46,07	0,21

Foram calculadas a média e o desvio padrão, e os valores foram transformados em porcentagem para facilitar a análise dos dados, conforme descrito na TABELA 15:

TABELA 15 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar MacConkey em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.

Cálculos	Valores antes da refrigeração	Valores após 30 dias de refrigeração	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	45,66±4,28	45,53±4,30	0,13±0,05
%	100,00±9,37	99,71±9,42	0,28±0,11

A perda de peso total das placas foi de $0,28 \pm 0,11$ sendo inferior ao valor estabelecido de 5% que é considerado como desidratação significativa do meio de cultura⁶, dessa forma o lote foi aprovado. Não foi necessário verificar a presença de algum dado discrepante, uma vez que os valores encontrados foram coerentes.

4.1.3.3 Aspecto microbiológico

4.1.3.3.1 Promoção de crescimento

4.1.3.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10^{-6} , dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida esta descrita na TABELA 16.

TABELA 16 -- Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar MacConkey no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	60	60	60	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	60	50	60	57

4.1.3.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

As colônias do micro-organismo de *Escherichia coli* apresentaram-se rosas e a contagem das placas do meio Á. Mac teve resultados acima de 10 UFC/placa. O crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus* foi inibido nas placas do meio Á. Mac. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem das placas e a média obtida esta descrita na TABELA 17:

TABELA 17 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar MacConkey:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Escherichia coli</i>	8739	40	50	50	47
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	00	00	00	-

4.1.2.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

4.2 Ágar Sabouraud

4.2.1 TEMPO ZERO

4.2.1.1 Análise da identificação e registros de produção

A avaliação da identificação do meio de cultura como nome, número de lote, fabricação, validade e condições de armazenamento, bem como verificação das fichas de produção e de controle visual entregues ao LCQ-UHPMC foram considerados aprovados, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.2.1.2 Aspectos físico-químicos

4.2.1.2.1 Aspecto físico

A análise das características físicas como cor, gelificação e homogeneidade foi realizada visualmente. As placas apresentaram coloração homogênea, sem precipitados, e gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.2.1.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 5,6 e atende ao intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $5,6 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 18:

TABELA 18 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no TEMPO ZERO.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	5,6
02	5,6
03	5,6
MÉDIA	5,6

4.2.1.2.3 Aspecto da desidratação

No Tempo zero não tem possibilidade de avaliar a perda de peso e consequente desidratação uma vez que os meios são testados em até 24 horas após o preparo.

4.2.1.3 Aspecto microbiológico

4.2.1.3.1 Promoção de crescimento

4.2.1.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10⁻⁶, dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida está descrita na TABELA 19.

TABELA 19 – Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no TEMPO ZERO.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	36	42	40	39

4.2.1.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

O crescimento do micro-organismo *Candida albicans* apresentou colônias brancas e a contagem e somatório das placas do meio Á. SDA teve resultados acima de 10UFC. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem obtida esta descrita na TABELA 20.

TABELA 20 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud, inoculadas até 24 horas após o preparo:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	63	63	66	64

4.2.1.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

4.2.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Todos os parâmetros avaliados no TEMPO ZERO foram repetidos nas placas que foram expostas em condições extremas, permanecendo durante 15 dias de incubação, em estufa com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

4.2.2.1 Análise da identificação e registros de produção

As identificações das etiquetas e os formulários foram confirmados nas placas separadas para o estudo. A verificação foi aprovada, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.2.2.2 Aspectos físico-químicos

4.2.2.2.1 Aspecto físico

As características organolépticas como cor, gelificação e homogeneidade foram mantidas estáveis, sem alterações visíveis. As placas estavam com coloração homogênea, sem precipitados, gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.2.2.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 5,54 e atende ao do intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $5,6 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 21:

TABELA 21 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	5,55
02	5,55
03	5,53
MÉDIA	5,54

4.2.2.2.3 Aspecto da desidratação

As placas separadas para o estudo de estabilidade acelerada foram pesadas antes e após o término do período de incubação. Os valores estão descritos na TABELA 22:

TABELA 22 - Peso e perda de água do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.

Identificação das placas de Á.SDA	Peso das unidades antes da incubação peso (g)	Peso das unidades após 15 dias incubação em condição extrema Peso (g)	Perda de água (g)
01	41,98	40,03	1,95
02	34,79	33,28	1,51
03	33,00	30,94	2,06
04	37,64	36,01	1,63
05	36,63	34,40	2,23
06	31,07	27,92	3,15
07	36,06	35,04	1,02
08	32,81	31,92	0,89
09	30,83	30,06	0,77
10	34,33	33,26	1,07
11	32,07	30,98	1,09
12	35,37	33,92	1,45

Foram calculadas a média e o desvio padrão, e os valores foram transformados em porcentagem para facilitar a análise dos dados, conforme descrito na TABELA 23:

TABELA 23 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias.

Cálculos	Valores antes da incubação	Valores após 15 dias incubação	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	34,71 \pm 3,15	33,14 \pm 3,15	1,56 \pm 0,68
%	100,0 \pm 9,07	95,48 \pm 9,07	4,49 \pm 1,95

A perda de peso total das placas foi de 4,49 \pm 1,95. Para verificar se existe a presença de algum dado discrepante, uma vez que o desvio padrão calculado foi alto, o *outlier* foi pesquisado de acordo com os critérios de Grubbs conforme descrito na TABELA 24:

TABELA 24 – Critério de Grubbs para identificação de *outlier*, nos valores da perda de água do meio Ágar Sabouraud em placa no Estudo de Estabilidade Acelerada

Identificação	Perda de água	G_1 / G_n	Valor G tabelado N = 6 $G_{\text{tabelado}} 2,285^*$
X ₁	0,77	1,15	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₂	0,89	0,98	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₃	1,02	0,80	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₄	1,07	0,72	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₅	1,09	0,69	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₆	1,45	0,17	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₇	1,51	0,08	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₈	1,63	0,09	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₉	1,95	0,55	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₁₀	2,06	0,71	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₁₁	2,23	0,96	$G_1 < G_{\text{tabelado}}$
X ₁₂	3,15	2,289	$G_1 > G_{\text{tabelado}}$

Foi evidenciado que os resultados da média e do desvio padrão foram distorcidos pelo valor de 2,289 encontrado na placa 06 (X₁₂) que apresentou-se maior do que o valor tabelado 2,285. O valor tabelado foi retirado da tabela valores crítico para G₁ e G_n dos critérios de Grubbs. Ele foi considerado um *outlier*. Uma vez identificado o *outlier* o valor foi retirado da tabela e os valores foram calculados, conforme descrito na TABELA 25:

TABELA 25 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a incubação dos meios incubados em estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 dias, após a retirada do *outlier*.

Cálculos	Valores antes da incubação	Valores após 15 dias incubação	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	35,4 \pm 3,07	33,62 \pm 2,81	1,42 \pm 0,49
%	100,00 \pm 8,76	95,94 \pm 8,02	4,05 \pm 1,39

A perda de peso total das placas foi de 4,05 \pm 1,39, podendo ser superior ao valor estabelecido de 5% que é considerado como desidratação significativa do meio de cultura⁶, dessa forma o lote foi reprovado.

4.2.2.3 Aspecto microbiológico

4.2.2.3.1 Promoção de crescimento

4.2.2.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10^{-6} , dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida esta descrita na TABELA 26.

TABELA 26 – Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	42	36	37	38

4.2.2.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

O crescimento do micro-organismo *Candida albicans* apresentou colônias brancas e a contagem e somatório das placas do meio Á. SDA teve resultados acima de 10UFC. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem obtida esta descrita na TABELA 27.

TABELA 27 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	46	40	43	43

4.2.2.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

4.2.3 CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE

Todos os parâmetros avaliados no TEMPO ZERO e no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foram repetidos nas placas que foram mantidas nas condições ideais de armazenamento, em geladeira 2° a 8°C durante 30 dias após o preparo.

4.2.3.1 Análise da identificação e registros de produção

As identificações das etiquetas e os formulários foram confirmados nas placas separadas para o estudo. A verificação foi aprovada, todos os registros e rótulos estavam com as informações corretas.

4.1.3.2 Aspectos físico-químicos

4.1.3.2.1 Aspecto físico

As características organolépticas como cor, gelificação e homogeneidade foram mantidas estáveis, sem alterações visíveis. As placas estavam com coloração homogênea, sem precipitados, gelificação adequada. Dessa forma o lote com essas características foi considerado aprovado.

4.1.3.2.2 Verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura

A média dos valores aferidos foi 5,62 e atende ao intervalo estabelecido no rótulo do fabricante que é de $5,6 \pm 0,2$, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

A verificação de potencial de hidrogênio (pH) final do meio de cultura foi realizada em triplicata, conforme descrito na TABELA 28:

TABELA 28 – Determinação em triplicata e média dos valores de pH na superfície do ágar Sabouraud no estudo de CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE.

IDENTIFICAÇÃO	pH final
01	5,62
02	5,62
03	5,62
MÉDIA	5,62

4.1.3.2.3 Aspecto da desidratação

As placas separadas para o estudo de confirmação da validade foram pesadas antes e após o término do período de incubação. Os valores estão descritos na TABELA 29:

TABELA 29 – Peso e perda de água do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.

IDENTIFICAÇÃO	Peso das unidades antes da refrigeração (g)	Peso das unidades após 30 dias de refrigeração	PERDA DE ÁGUA (g)
Placa 01	43,53	43,38	0,15
Placa 02	39,31	39,19	0,12
Placa 03	36,41	36,21	0,2
Placa 04	43,14	42,98	0,16
Placa 05	39,23	39,13	0,1
Placa 06	44,66	44,51	0,15
Placa 07	37,57	37,45	0,12
Placa 08	37,09	36,88	0,21
Placa 09	37,33	37,16	0,17
Placa 10	40,95	40,78	0,17
Placa 11	39,25	39,13	0,12
Placa 12	30,32	30,18	0,14

Foram calculadas a média e o desvio padrão, e os valores foram transformados em porcentagem para facilitar a análise dos dados, conforme descrito na TABELA 30:

TABELA 30 – Média e desvio padrão dos pesos do meio ágar Sabouraud em placas antes e após a manutenção dos meios refrigerados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ por 30 dias.

Cálculos	Valores antes da refrigeração	Valores após 30 dias refrigeração	Valores da perda de água
MÉDIA /Desvio padrão	39,06±3,86	38,91±3,86	0,15±0,03
%	100,00±9,88	99,61±9,88	0,38±0,07

A perda de peso total das placas foi de $0,38 \pm 0,07$ sendo inferior ao valor estabelecido de 5% que é considerado como desidratação significativa do meio de cultura⁶, dessa forma o lote foi aprovado. Não foi necessário verificar a presença de algum dado discrepante, uma vez que os valores encontrados foram coerentes.

4.1.3.3 Aspecto microbiológico

4.1.3.3.1 Promoção de crescimento

4.1.3.3.1.1 Controle da diluição

Após a contagem das colônias em meio padrão Ágar TSA, para controle das diluições foi calculada a média das contagens da diluição 10^{-6} , dessa forma foi obtido o inóculo <100 UFC/mL para uso nos testes de promoção de crescimento. A contagem obtida esta descrita na TABELA 31.

TABELA 31 – Número total e média de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio Ágar TSA, para controle da diluição utilizada para teste do meio Ágar Sabouraud no ESTUDO DE COFIRMAÇÃO DA VALIDADE.

Micro-organismo	ATCC	Controle diluição Placa 01 UFC/mL	Controle diluição Placa 02 UFC/mL	Controle diluição Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	37	32	32	34

4.1.3.3.1.2 Teste de promoção de crescimento do meio de cultura

O crescimento do micro-organismo *Candida albicans* apresentou colônias brancas e a contagem e somatório das placas do meio Á. SDA teve resultados acima de 10UFC. Dessa forma o lote foi considerado aprovado. A contagem obtida esta descrita na TABELA 32.

TABELA 32 - Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) em triplicata e a média obtida dos valores, no meio ágar Sabouraud:

Micro-organismo	ATCC	Contagem Placa 01 UFC/mL	Contagem Placa 02 UFC/mL	Contagem Placa 03 UFC/mL	MÉDIA
<i>Candida albicans</i>	10231	72	60	75	69

4.1.2.3.2 Teste de esterilidade

A análise visual das placas não apresentaram alterações ou contaminação após o período de incubação, dessa forma o lote foi considerado aprovado.

5 DISCUSSÃO

A análise da identificação e registros de produção dos dois lotes de meios de cultura Ágar MacConkey e Ágar Sabouraud foi satisfatório. Todas as unidades avaliadas estavam identificadas com nome, número de lote, fabricação, validade e condições de armazenamento, além disso as fichas de produção e de controle visual estavam preenchidas corretamente. Essa etapa é determinante para o prosseguimento dos testes, qualquer desvio deve ser corrigido, pois dessa forma esta garantida a rastreabilidade do produto e testes realizados.

As características físicas como cor, gelificação e homogeneidade foram mantidas inalteradas em todos os tempos de estudo (TEMPO ZERO, ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA e CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE) para os dois lotes de meios de cultura utilizados Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey, dessa forma os lotes foram aprovados para esse parâmetro. A análise visual dos aspectos físicos identifica a precipitação de corantes, a alteração do valor de pH pois essa ocorrência pode alterar a coloração do meio, entre outras ocorrências.

O meio de cultura pronto deve ter valor de pH final dentro da faixa aceitável. É importante ressaltar que não há agentes tamponantes na composição dos meios utilizados nesse estudo.

Para o meio de cultura ágar MacConkey o valor de referência é de $7,1 \pm 0,2$, a média dos valores aferidos no TEMPO ZERO foi de 7,00, no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foi de 6,92 e no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE foi de 6,96. No ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foi observada a queda no valor de pH em relação ao encontrado no TEMPO ZERO e o mesmo ocorreu de maneira mais acentuada no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE mas ainda assim as variações dos valores encontrados apresentaram-se dentro do intervalo estabelecido, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro. É importante ressaltar que não há agentes tamponantes na composição dos meios utilizados nesse estudo.

Para o meio de cultura ágar Sabouraud o valor de referência é de $5,6 \pm 0,2$, a média dos valores aferidos no TEMPO ZERO foi de 5,6, no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO foi de 5,5 e no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE foi de 5,6. No ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foi observada a queda no valor de pH em relação ao encontrado no TEMPO ZERO e no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA

VALIDADE não foi observada variações, dessa forma o lote foi considerado aprovado para esse parâmetro.

As unidades pesadas não devem ter perda de água superior a 5% do peso inicial. A água é o solvente dos nutrientes no meio promovendo assim o uso pelos micro-organismos. O valor do peso encontrado entre as placas foi variável uma vez que o volume de meio de cultura é distribuído manualmente por placa, variando de 23 a 25mL.

Para o meio ágar MacConkey no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA a perda de peso total das placas foi de $2,77 \pm 0,89$, após a retirada do outlier, no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE a perda de peso total das placas foi de $0,28 \pm 0,11$ e não foi necessário verificar a presença de algum dado discrepante “outlier”, uma vez que os valores encontrados foram coerentes. A perda de água no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE quando as unidades permanecerão 30 dias refrigeradas foi consideravelmente menor do que a perda no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA quando as unidades permanecerão durante 15 dias em estufa. Esses dados confirmam que a temperatura adequada de armazenamento das placas deve ser sobre refrigeração, mantendo-se adequada pelo menos durante 30 dias.

Para o meio ágar Sabouraud no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA a perda de peso total das placas foi de $4,05 \pm 1,39$, após a retirada do outlier, no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE a perda de peso total das placas foi de $0,38 \pm 0,07$ e não foi necessário verificar a presença de algum dado discrepante “outlier”, uma vez que os valores encontrados foram coerentes. A perda de água no ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE quando as unidades permanecerão 30 dias refrigeradas foi consideravelmente menor do que a perda no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA quando as unidades permanecerão durante 15 dias em estufa. A média com o desvio padrão dos valores obtidos no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA foi insatisfatória pois pode ultrapassar o percentual de 5% do peso inicial e dessa forma comprometer o crescimento de micro-organismo.

O resultado insatisfatório obtido no ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA demonstra a importância da manutenção do meio em condições refrigeradas e a necessidade de cuidados durante o transporte do produto. Esses dados confirmam que a temperatura adequada de armazenamento das placas deve ser sobre refrigeração, mantendo-se adequada pelo menos durante 30 dias.

Em relação ao aspecto microbiológico para o meio ágar MacConkey foram utilizados dois micro-organismos *Escherichia coli* como controle positivo para análise da diferenciação de fermentação de lactose e *Staphylococcus aureus* como controle negativo para a análise da seletividade do meio.

No TEMPO ZERO, ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE as colônias do micro-organismo de *Escherichia coli* apresentaram-se rosas e a média das contagem das placas do meio foi de 57 UFC/mL (controle da diluição 67 UFC/ mL), 43 UFC/mL (controle da diluição 63 UFC/ mL) e 47 UFC/mL (controle da diluição 60 UFC/ mL), respectivamente.

No TEMPO ZERO, ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA e CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE não houve crescimento do micro-organismo *Staphylococcus aureus*, a média do controle da diluição utilizada foi de 63 UFC/ mL; 60UFC/mL; 57 UFC/mL respectivamente.

No ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA a média do número de unidades formadoras de colônias foi menor do que o encontrado no TEMPO ZERO. No ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE a média do número de unidades formadoras de colônias foi menor do que o encontrado no TEMPO ZERO, com valores próximos do obtido no ESTUDO ACELERADO, mas ainda assim o crescimento foi aprovado, uma vez que a diferenciação e seletividade foram mantida, pois o micro-organismo *S. aureus* continuou sendo inibido.

O micro-organismo *Escherichia coli* é fermentadora de lactose e dessa forma produz ácidos mistos e precipitação dos sais biliares do ágar, os quais levaram a redução do pH para valores abaixo de 6,8 modificando a cor do indicador para vermelho e assim as colônias apresentaram tonalidade rosada. As bactérias que não são capazes de fermentar a lactose mantêm-se incolores ou transparentes, para esse trabalho não foi utilizado micro-organismo não fermentador de lactose, sendo assim esse aspecto não foi avaliado.

A lactose é um dissacarídeo composto por moléculas de glicose e galactose unidas por ligação β -galactosídica. A habilidade da bactéria de fermentar a lactose vai depender da sua capacidade de sintetizar a β -galactosídeo permease, proteína responsável pelo seu transporte através da parede celular bacteriana, e pela enzima β -galactosidase, capaz de hidrolisar a lactose em glicose e galactose. Estes açúcares são catabolizados pela via Embden-Meyerhof (EMP) a ácido pirúvico, e este, dependendo da via metabólica presente na bactéria, é

posteriormente metabolizado por meio de um processo de fermentação ácidos mistos ou fermentação de butileno glicol. A *E. coli* fermenta a lactose pela via ácida mista ¹.

A esterilidade foi mantida em todos os tempos de estudo (TEMPO ZERO, ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA e CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE) para os dois lotes de meios de cultura utilizados Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey, dessa forma os lotes foram aprovados para esse parâmetro em todas as etapas. A ausência de contaminação é importante para evitar a inibição do crescimento de micro-organismo de interesse.

Em relação ao aspecto microbiológico para o meio ágar Sabouraud foi utilizado o micro-organismos *Candida albicans* como controle positivo para análise do crescimento, uma vez que o meio não foi suplementado com antibiótico não foi necessário avaliar a seletividade com um controle negativo.

No TEMPO ZERO, ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE a média das contagem das colônias do micro-organismo *Candida albicans* nas placas do meio foi de 64 UFC/mL (controle da diluição 39 UFC/ mL), 43 UFC/mL (controle da diluição 38 UFC/ mL) e 69 UFC/mL (controle da diluição 34 UFC/ mL), respectivamente. O controle da diluição apresentou contagem menor em relação aos testes de promoção de crescimento. Esse fato é deve-se ao meio utilizado para o plaqueamento, para o controle da diluição é utilizado o meio Ágar TSA padrão não específico para o crescimento fúngico e a promoção de crescimento foi realizada no meio A. SDA que promove o crescimento de fungos.

No ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA a média do número de unidades formadoras de colônias foi menor do que o encontrado no TEMPO ZERO, mas ainda assim o crescimento foi aprovado. Nessa etapa as unidades tiveram perda de água superior a 5%, mas não houve comprometimento do crescimento do micro-organismo. No ESTUDO DE CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE a média do número de unidades formadoras de colônias foi bem próxima do que o encontrado no TEMPO ZERO, mesmo após o período de 30 dias de refrigeração.

Após as análises dos resultados de todos os parâmetros dos estudos de estabilidade dos meios Ágar Sabouraud e Ágar MacConkey fica comprovada a garantia da estabilidade dos produtos durante 30 dias, desde que as placas sejam devidamente armazenadas sobre refrigeração em temperatura 2-8°C.

6 CONCLUSÃO

O protocolo elaborado mostrou-se adequado para o alcance dos objetivos propostos, sendo possível analisar a performance do meio de cultura sólido em placa de Petri sobre vários parâmetros.

Foi possível definir, nesse momento, a conformidade dos lotes para uso com validade definida dentro de um mês. É desejável que o protocolo seja aplicado com frequência anual, para garantir a reprodutibilidade e repetibilidade dos testes. É possível estender o prazo de validade de acordo com a necessidade desejada e aplicar os estudos para a verificação.

Os resultados obtidos para um determinado meio de cultura pode ser extrapolado para outros meios de cultura que possuam as mesmas características, formando assim grupos de estudo, não sendo necessário realizar estudo em todos os meios existentes no laboratório.

As validades confirmadas e definidas aplicam-se ao teste de estabilidade realizado pelo laboratório de controle de qualidade dos meios de cultura produzidos pela FUNED/UHPMC utilizando embalagens, metodologia de preparo, marcas de fabricantes de meios de cultura desidratados e condições de estocagem próprias. Para a definição de prazo de validade fora dessas condições a metodologia sugerida pode ser utilizada e diferentes resultados podem ser obtidos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das diversas possibilidades de utilização e relevância dos meios de cultura para o ambiente laboratorial torna-se imprescindível considerar a qualidade do produto e confiabilidade do fornecedor. Com a aplicação prática do protocolo em dois lotes de meios de cultura foi possível concluir que é de fundamental importância para a realização dos estudos de estabilidade em meios de cultura ter comprometimento para o cumprimento dos prazos, insumos disponíveis, área física adequada, equipamentos qualificados e aprovados mas acima de tudo recursos humanos qualificados.

Para garantir a qualidade final do meio preparado, as etapas produtivas devem ser realizadas por pessoal treinado, utilizar vidraria adequada, insumos de qualidade comprovada, além da qualidade da água, esses fatores são relevantes para a determinação do prazo de validade.

Portanto, ao utilizar um meio de cultura o profissional precisa estar ciente da importância do meio de cultura para a realização da análise e das consequências que a utilização de um produto inadequado ou de qualidade duvidosa pode trazer ao seu diagnóstico.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 Konemen, E.W. Trad. Cury, A.E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5ª. Ed., MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.
- 2 Madigan, M.T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12ª edição. Editora Artmed. São Paulo, 2010.
- 3 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. Modulo IV 2004.64p.
- 4 Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ª. edição. Editora Varela, São Paulo, 2001
- 5 Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2 a. Ed., Rio de Janeiro, 1994.
- 6 Oxoid. **Manual Oxoid**. 1ª Ed. BRASIL, 2000.
- 7 Becton, Dickinson and Company. Difco e BBL **Manual of Microbiological Culture Media**. 2 Ed., United States of America, 2009.
- 8 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Acreditação para laboratório de Microbiologia**. Tradução do Gerente-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Brasília. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.33p.
- 9 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 210**. 2003. 124p.
- 10 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso *in vitro*. **NOTA TÉCNICA N° 001**. 2008. 1p.
- 11 ISAAC, V.L.B.; CEFAL, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. **Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos**. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.
- 12 MORETTO, L. D. **A estabilidade de fármacos e medicamentos**. *Pharmaceutical Technology*, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 46 – 48. 1999.
- 13 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 686 Boas Práticas de Fabricação e Controle para Produtos Diagnósticos de uso "in vitro"**. 1998.13p.
- 14 Farmacopeia Brasileira 5ª edição.
- 15 Norma Regulamentadora ISO/IEC 17043:2010 – Conformity assessment - General requirements for proficiency testing, item 3.5.
- 16 Norma Regulamentadora NBR: ISO IEC 17025:2005

APÊNDICE 1

PROTOCOLO PARA ESTUDO DE ESTABILIDADE DE MEIOS DE CULTURA

Elaborado por: Luciana de S. M. F. Boy
Verificado por: Ana Paula de Faria Barbosa
Aprovado por: Maria Aparecida Galvão

SUMÁRIO

- 1. OBJETIVO**
- 2. CAMPO DE APLICAÇÃO**
- 3. FUNDAMENTOS**
- 4. DEFINIÇÕES**
- 5. RESPONSABILIDADES**
- 6. SIGLAS**
- 7. INSTRUMENTAL**
- 8. REAGENTES E MATERIAIS**
 - 8.1 Reagentes**
 - 8.2 Materiais**
- 9. PROCEDIMENTOS**
 - 9.1 Cuidados**
- 10. CÁLCULO**
- 11. REGISTRO**
- 12. DISTRIBUIÇÃO**
- 13. FLUXOGRAMA**
- 14. HISTÓRICO DE REVISÕES**
- 15. ANEXOS**
- 16. REFERÊNCIAS**

1. OBJETIVO

Estabelecer o prazo de validade e verificar as características físico-químicas, microbiológicas e de esterilidade dos meios de cultura, através de estudo de estabilidade.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao controle de qualidade dos meios de cultura produzidos pela UHPMC.

3. FUNDAMENTOS

O teste de estabilidade é baseado nas legislações de estudo de estabilidade para produtos farmacêuticos.

4. DEFINIÇÕES

Para efeito deste procedimento aplicam-se as seguintes definições:

- **Estudo de Estabilidade:** Conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos quanto aos limites previamente especificados, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de estocagem determinadas.
- **Prazo de Validade:** Data limite para a utilização de um produto definido pelo fabricante, com base nos seus respectivos testes de estabilidade, mantidas as condições de armazenamento e transporte estabelecidos.
- **Tempo Zero:** Realização dos testes após o preparo do meio, no tempo máximo de 24 horas para análise da amostra.
- **Estabilidade Acelerada:** Realização dos testes após as amostras terem sido expostas a condições extremas. Estudos projetados para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições de estocagem forçadas. É iniciada juntamente com a análise feita no TEMPO ZERO.
- **Confirmação da Validade:** Realização dos testes após as amostras terem sido expostas nas condições ideais e terem atingido o tempo de validade estabelecido. É estabelecido de acordo com a validade previamente definida ou aquela que se pretende estabelecer. Ex.: 30 ou 60 dias. O produto será estocado nas condições ideais de armazenamento.
- **Lote:** É uma quantidade definida de um produto terminado obtido em um único processo ou série de processos, cujas características essenciais são a homogeneidade e quantidade dentro dos limites especificados⁷.
- **Embalagem Primária:** Embalagem que está em contato direto com o produto e que pode se constituir em recipiente ou envoltório destinado a enxaguar ou manter, cobrir ou empacotar matérias-primas, produtos semi-elaborados ou produtos acabados.
- **Embalagem Secundária:** Embalagem que não entra em contato direto com o produto e que pode se constituir em recipiente ou envoltório destinado a acondicionar o produto acabado.
- **Meio de Cultura:** Mistura de compostos orgânicos e inorgânicos, contendo ágar ou não, destinado ao cultivo *in-vitro* de micro-organismos, fornecendo os princípios nutritivos indispensáveis ao seu crescimento.

- **ATCC:** A AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) é um instituto, sem fins lucrativos, dedicado à conservação e distribuição de autênticas culturas de micro-organismos vivos.
- **Limites de Especificação:** Variação permitida para o teor de ativo e propriedades físico-químicas e microbiológicas e/ou organolépticas da formulação estabelecidas pelo fabricante que assegura as características de segurança e de eficácia durante o prazo de validade preconizado.

5. RESPONSABILIDADES

UHPMC- Produção

- Produzir os meios de cultura conforme o procedimento DIOM-UHPMC-MET 0019 e outros específicos como, por exemplo, IAL, LJ;
- Realizar o controle visual e enviar amostras para o laboratório de controle de qualidade conforme o procedimento DIOM-UHPMC-MET 0005 com acréscimo de alíquotas para o estudo de estabilidade.

NOTA: As alíquotas para os testes de estabilidade serão separadas durante o controle visual e na quantidade descrita nesse procedimento.

UHPMC- Laboratório de Controle de Qualidade

- Avaliar os meios conforme os limites de especificação estabelecidos nos procedimentos;
- Monitorar as amostras na referência futura;
- Realizar os testes de estabilidade dos meios de cultura conforme descrito neste procedimento.

UHPMC- Coordenação e Referência Técnica

- Realizar análise crítica dos resultados dos testes de estabilidade;
- Elaborar relatórios e definir prazo de validade.

6. SIGLAS

ATCC	A AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CSB	Cabine de Segurança Biológica
DIOM	Diretoria do Instituto Octávio Magalhães
DPGQ	Divisão de Planejamento e Gestão da Qualidade
FUNED	Fundão Ezequiel Dias
MC	Meio de Cultura
MET	Metodologia
UFC	Unidade Formadora de Colônia

7. INSTRUMENTAL

- Densimat (turbidímetro ou escala 0,5 de MCFARLAND)
- Refrigerador industrial
- Estufa bacteriológica
- Estufa BOD
- Phmetro
- Agitador de tubos
- Cabine de segurança biológica.

8. REAGENTES E MATERIAIS

8.1 Reagentes

- Cepas ATCC
- Salina 0,9% OU APT 0,1%

8.2 Materiais

- Alça Descartável 1 μ OU 10 μ
- Gaze estéril
- Alça Drigalsk
- Tubo de ensaio estéril.
- Pipeta estéril
- Tubo de Hemólise

9. PROCEDIMENTOS

9.1 Cuidados

Uso de EPI (mascara touca, luvas de procedimento e jaleco).

9.2 Prazo de validade

O prazo de validade caracterizado como o período de vida útil durante o qual o produto mantém suas características originais antes de ser um requisito legal é, sobretudo um requisito técnico de qualidade, pois um produto instável do ponto de vista físico-químico e microbiológico, além da perda de eficácia poderá também causar algum dano e comprometer a confiabilidade frente aos resultados microbiológicos a serem obtidos com o uso do meio de cultura.

- O prazo de validade é garantido com as embalagens íntegras, a partir do momento em que a embalagem são violadas a performance do produto pode ser comprometida.
- Todos os testes serão realizados com as amostras armazenadas de forma adequada e monitoramento contínuo das embalagens e temperatura de armazenamento.

- O prazo de validade é estimado por meio do Estudo de Estabilidade que esta descrito nesse procedimento.

NOTA: Os meios de cultura são preparados, armazenados e testados conforme recomendado nos manuais dos fabricantes de meios de cultura das marcas Difco, Merck, Oxoid, Prodimol, Acumedia e Himedia, no manual da ANVISA- Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos e recomendações da PHARMACOPEIA BRASILEIRA.

O prazo de validade e condições de armazenamento estão estabelecidos no formulário DIOM-UHPMC-FM 0353.

9.3 Amostragem

Todos os meios de cultura produzidos na UHPMC serão avaliados quanto a estabilidade, de acordo com cronogramas elaborados em acordo com a Chefia, RT, produção de meio de L.C.Q.

Os lotes que forem preparados pela UHPMC na Fundação Ezequiel Dias serão amostrados aleatoriamente durante a realização de análise visual do lote preparado seguindo os critérios determinados no formulário DIOM-UHPMC-FM 0183, e então separadas por embalagem secundária com rótulo de identificação de estabilidade.

Após análise do controle visual as amostras serão enviadas para o laboratório de controle de qualidade (LCQ) da UHPMC acompanhadas da ficha de produção do meio e o formulário de controle visual realizado.

No LCQ as amostras serão recebidas, identificadas conforme modelo no ANEXO A e separadas de acordo com os testes a serem realizados. Os dados referentes à amostra, teste e resultados serão registrados, para posterior análise crítica dos resultados no formulário DIOM-UHPMC-FM 0376.

Durante todo estudo de estabilidade as amostras deverão permanecer armazenadas nas embalagens primárias e secundárias originais.

Será elaborado um protocolo de estudo específico para cada meio de cultura em estudo de estabilidade. A quantidade de amostras necessárias para cada estudo será de no mínimo 15 amostras estudo. O número de amostras necessário para os estudo poderá variar, dependendo do meio de cultura estudado.

9.4 Testes

Para o desenvolvimento do estudo de estabilidade as amostras serão testadas em tempos e condições definidas.

- **TEMPO ZERO:** Realização dos testes após o preparo do meio, no tempo máximo de 24 horas para análise da amostra.
- **ESTUDO ACELERADO:** Realização dos testes após as amostras terem sido expostas a condições extremas.

- **VERIFICAÇÃO DA VALIDADE:** Realização dos testes após as amostras terem sido expostas nas condições ideais e terem atingido o tempo de validade estabelecido.

Para cada estudo de estabilidade Tempo zero, Estudo acelerado e Verificação da validade as análises serão realizadas em triplicata para as análises físicas, químicas e microbiológicas. Os estudos serão detalhados na sequência abaixo.

9.4.1 Plano de estudo para TEMPO ZERO

Neste plano de estudo, serão avaliados os aspectos físicos, químicos e microbiológicos do meio de cultura entre 12-24 horas após o seu preparo.

Serão necessárias aproximadamente 18 amostras, para a realização do teste no Tempo Zero em triplicata. Conforme descrito na TABELA 01:

TABELA 01- Número total de amostras avaliadas no tempo zero.

PH	ESTERILIDADE	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO	TOTAL
3	3	12	18

Os resultados obtidos a partir desse estudo são utilizados para a liberação do lote para uso e definem sobre a continuidade dos outros estudos que estão contemplados nesse procedimento.

9.4.2 Plano de estudo para ESTABILIDADE ACELERADA

Neste plano de plano de estudo, serão avaliados os aspectos físicos, químicos e microbiológicos do meio de cultura após a exposição em condições extremas. As amostras serão armazenadas em estufa ou geladeira assim que forem recebidas no LCQ da seguinte maneira:

Meios de cultura armazenados temperatura ambiente:

- Exposição na temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ em estufa;
- Exposição na temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ em geladeira.

Meios de cultura armazenados geladeira ($5^{\circ}\text{C} \pm 3$):

- Exposição na temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Os lotes permaneceram nas condições extremas descritas acima durante a metade do prazo de validade estabelecido. Ex.: exposição durante 15 dias para meios com prazo de

validade até 30 dias. A validade para cada meio de cultura esta estabelecida no formulário DIOM-UHPMC-FM 0353.

Serão necessárias aproximadamente 18 amostras aproximadamente, para a realização do teste de ESTABILIDADE ACELERADA em triplicata. Conforme descrito na TABELA 02:

TABELA 02- Número total de amostras avaliadas no estudo acelerado

PH	ESTERILIDADE	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO	TOTAL
3	3	12	18

Os resultados obtidos a partir desse estudo são utilizados em conjunto com o estudo no TEMPO ZERO bem como CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE, para avaliar alterações que possam interferir em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas para o produto, que podem ocorrer durante o transporte por exemplo.

9.4.3 Plano de estudo para VERIFICAÇÃO DA VALIDADE

Neste plano de estudo, serão avaliados os aspectos físicos, químicos e microbiológicos do meio de cultura após o prazo de validade. Os meios são mantidos nas condições ideais de armazenamento, sugerida previamente.

Serão necessárias aproximadamente 18 amostras, para a realização do teste para a CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE em triplicata. Conforme descrito na TABELA 03:

TABELA 3 - Número total de amostras avaliadas para confirmação da validade

PH	ESTERILIDADE	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO	TOTAL
3	3	12	18

Os resultados obtidos a partir desse estudo são comparados com os dados no TEMPO ZERO bem como ESTUDO ACELERADO e são utilizados para confirmar ou avaliar o prazo de validade de um determinado meio de cultura.

NOTAS:

- A quantidade de amostras para a promoção de crescimento pode variar de acordo com os micro-organismos que são testados. Serão elaborados planos de estudo para cada tipo de meio de cultura, considerando suas especificidades.
- O que definirá a quantidade exata de amostras totais será o tipo de meio de cultura amostrado.

9.5 Metodologia e Critérios de Avaliação

Os meios de cultura serão avaliados quanto aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos descritos abaixo:

9.5.1 Aspectos físicos

Análise do rótulo e formulários: será avaliada a identificação do meio de cultura onde determine nome, número de lote, fabricação, validade e condições de armazenamento, bem como verificação da ficha de controle visual entregue ao LCQ-UHPMC onde será realizado o estudo de Estabilidade.

Metodologia: Análise visual e técnica.

Critérios de aceitabilidade: Apresentação de todos os documentos e rótulos com as informações corretas - APROVADO.

Critérios de rejeição: Falta de qualquer documento ou erro no preenchimento dos formulários e rótulo sem as informações necessárias – REPROVADO.

NOTA: Os resultados encontrados não interferem no desenvolvimento do estudo. Serão utilizados para a melhoria do processo.

9.5.1.2 Características organolépticas: avaliação de cor, gelificação e homogeneidade.

Metodologia: Análise visual.

Critério de aceitabilidade: meio homogêneo, sem precipitados, gelificação boa com a cor dentro do estabelecido pelo fabricante –APROVADO.

Critério de rejeição: presença de precipitados, gelificação insatisfatória, dissolução e homogeneização inadequada e cor fora do estabelecido pelo fabricante - REPROVADO.

9.5.1.3 Aspecto da desidratação: Será avaliada a perda de água nos meios de cultura distribuídos em placas.

Metodologia: Pesagem das placas em balança calibrada antes e após os estudos realizados.

Critério de aceitabilidade: Perda de peso inferior a 5% - APROVADO.

Critério de rejeição: Perda de peso superior a 5% definirá a desidratação do meio de cultura – REPROVADO.

9.5.2 Aspecto químico

Verificação de potencial de hidrogênio (pH): pH final do meio de cultura.

Metodologia: Uso de potenciômetro calibrado com soluções certificadas 4,0 7,0 e 9,0;

Critério de aceitabilidade: dentro do intervalo estabelecido no rótulo – APROVADO.

Critério de rejeição: fora do intervalo estabelecido no rótulo – REPROVADO.

9.5.3 Aspecto microbiológico

Aspecto microbiológico: promoção de crescimento com micro-organismos controle. Será avaliado o cultivo de micro-organismos padrão específico para cada tipo de meio de cultura determinando a seletividade e diferenciação das colônias, bem como crescimento satisfatório.

Metodologia: Serão utilizadas cepas da AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) que é um instituto, sem fins lucrativos, dedicado à conservação e distribuição de autênticas culturas de micro-organismos vivos.

Critério de aceitabilidade: crescimento microbiano superior a 10 UFC.

Critério de rejeição: Crescimento microbiano inferior a 10 UFC.

9.6 Relatórios de Resultados da Estabilidade dos Meios de Cultura

Ao término dos estudos de estabilidade será elaborado um relatório com as seguintes informações:

- Identificação do produto;
- Material de acondicionamento utilizado no teste;
- Condições do estudo (condições de armazenamento das amostras, período de tempo do teste e periodicidade das avaliações)
- Resultados (poderão ser registrados na forma de tabela relacionando as condições de armazenamento, tempo e periodicidade das análises)
- Conclusão (avaliar resultados, relatar se o produto foi aprovado ou não, condições em que o teste foi conduzido e estimar o prazo de validade).
- Assinatura do responsável pelo estudo.

10. REGISTRO

- FORMULÁRIO DIOM-UHPMC-FM 0183
- FORMULÁRIO DIOM-UHPMC-FM 0376

11. ANEXOS

ANEXO A

 FUNED Fundação Ezequiel Dias	 IOM INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES
ESTUDO DE ESTABILIDADE	
<input type="checkbox"/> TEMPO ZERO <input type="checkbox"/> ACELERADO <input type="checkbox"/> CONFIRMAÇÃO DA VALIDADE	
<input type="checkbox"/> PH <input type="checkbox"/> PC <input type="checkbox"/> ESTERILIDADE	
Meio de cultura amostrado:	
Lote:	
Fabricação: ___/___/___	
Validade: ___/___/___	
Data de início do estudo: ___/___/___	
Término do estudo: ___/___/___	

12. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 43**. 2004.10p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Produtos para Diagnóstico de Uso *in vitro*. **NOTA TÉCNICA Nº 001**. 2008. 1p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 210**. 2003. 124p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Acreditação para laboratório de Microbiologia**. Tradução do Gerente-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Brasília. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.33p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 686 Boas Práticas de Fabricação e Controle para Produtos Diagnósticos de uso "in vitro"**. 1998.13p.

- ISAAC, V.L.B.; CEFAL, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. **Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos**. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.
 - MORETTO, L. D. **A estabilidade de fármacos e medicamentos**. *Pharmaceutical Technology*, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 46 – 48. 1999.
-

APÊNDICE 2

Fichas de produção e controle visual dos meios de cultura Agar Sabouraud e Ágar MacConkey

2.1 Ficha de produção do meio de cultura Ágar Sabouraud

I O M

INSTITUTO
OCTAVIO
MAGALHÃES

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS
INSTITUTO OCTAVIO MAGALHÃES
Unidade de Higienização e Produção de Meios de Cultura
Rua Conde Pereira Carneiro, 80 Belo Horizonte – MG
CEP: 30510-010 Tel: (31) 3371-9468 ou 3371-8862

I O M
INSTITUTO
OCTAVIO
MAGALHÃES

I O M

INSTITUTO
OCTAVIO
MAGALHÃES

TÍTULO: FICHA DE PRODUÇÃO DO MEIO DE CULTURA ÁGAR SABOURAUD - PLACAS **NÚMERO: UHPMC 0054**

Nome do Meio de Cultura: Ágar Sabouraud - Placas Lote: 12081953-1

Data: 09/08/12 Marca: Acumédia

Lote: 104,257 B Validade: Maio/2015 Técnico: Galvão

FINALIDADE: Utilizado para o cultivo de fungos dermatófitos e fungos patogênicos e não patogênicos de amostras clínicas ou de outra origem.

INSTRUÇÕES DE PREPARO:

- Para o preparo deste meio deve-se proceder de acordo com UHPMC – MET 0019;
- Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante;
- Adicionar 0,1g de cloranfenicol a cada litro produzido, quando este for solicitado pelo cliente;
- Homogeneizar;
- Verificar o pH de preparo, ajustando se necessário com ácido clorídrico p/ abaixar e hidróxido sódio p/ aumentar;
- Aquecer agitando frequentemente até a dissolução do ágar;
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos por autoclavagem;
- Esfriar em torno de 45 a 50 °C;
- Identificar as placas sempre que possível;
- Distribuir em placa de petri estéril evitando bolhas;
- Separar uma alíquota em copo descartável para verificação do pH final;
- Após a solidificação do meio, inverter as placas;
- Manter as placas na sala de envase (dentro da cabine) para o controle visual;
- Armazenar de acordo com o procedimento UHPMC – MET 0005.

Quantidade do Preparo: Volume Total: 1500 mL

Pesagem: Quantidade: 97,5 gramas

Cálculo(s): $65g \rightarrow 1000mL$
 $x \rightarrow 1500mL$
 $x = 97,5$

Patrimônio da balança:
 2423644-6 2423645-4
 14989 14910

pH ideal: 5,6 ± 0,2 pH preparo: 6,03 pH final: 5,6

ácido clorídrico hidróxido de sódio

Patrimônio pHmetro: 2416583-2 2423547-4 3243373-5 2425899-7 (cauda)

Distribuição: Placas: 90 x 15 mm Volume Unitário: 23 a 25 mL Lote das placas: 32875

Aditivo: Antibiótico: Cloranfenicol Marca: _____ Lote: _____ Val: _____

LIBERAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PELO CONTROLE DE QUALIDADE

Aprovado Reprovado

Técnica Responsável: aw Data: 13/08/12

ETIQUETA:

FUNED
Fundação
Ezequiel Dias

USO PARA DIAGNÓSTICO "IN VITRO"
ÁGAR SABOURAUD
10mL

Fab.: 09/08/12

Val.: 09/08/12 Lot.: 1953-1

Temperatura Armazenamento: 2 a 8°C
Resp. Técnico: Maria Aparecida Galvão
Biólogo - CRBio 49775/04-D

Revisão 04 18/05/2009 Página 1 de 1

2.2 Etiqueta de pesagem do meio de cultura Ágar Sabouraud

==== Relatorio de Formulacao <i>Andressa</i>	
GEHAKA <i>2423644-6</i>	BK3000
09/08/12	09:20
Nr. de Serie = 07022301001005	
Firmware Versao = 1.03	
Componente 1	97.50 g <i>A. Sabouraud</i>
Peso Total	97.50 g
=====	

note

etiquetas 05 pl.


2.3 Ficha de controle visual do meio de cultura Ágar Sabouraud



TÍTULO: CONTROLE VISUAL DOS MEIOS DE CULTURA		NÚMERO:	
		DIOM-UHPMC-FM 0183	
Meio de Cultura: <u>Ágar Sabouraud</u>		Lote: <u>12081953-1</u>	
Data de Fabricação: <u>09/08/12</u>		Data de Validade: <u>09/09/12</u>	
Temperatura de armazenagem: <input type="checkbox"/> 2 à 8°C <input type="checkbox"/> Temperatura Ambiente			
✓ Volume Produzido: <u>1500</u> ml = <u>60</u> unidades			
✓ Número de Unidades Produzidas: <u>40 placas + 02 frs c/4ml</u>			
<input type="checkbox"/> Tubos _____ mL <input checked="" type="checkbox"/> Placas <input type="checkbox"/> Frascos _____ mL <input type="checkbox"/> Outras			
✓ Iniciar Rastreabilidade <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não			
Análise Crítica: _____			
PARAMETROS DO CONTROLE VISUAL			
✓ Consistência	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
✓ Volume	<input type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
✓ Bolhas	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____
✓ Impurezas	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____
✓ Coloração	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
✓ Esterilidade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
✓ Precipitado	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____
✓ Grumos	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____
✓ Homogeneidade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
✓ Outro _____	<input type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____
ASPECTOS DE EMBALAGEM PRIMÁRIA			
Legenda: <input type="checkbox"/> Frouxa (1) <input type="checkbox"/> Trincado (2) <input type="checkbox"/> Quebrado (3) <input type="checkbox"/> Sujo (4)			
Tampa	(1) _____	(2) _____	(3) _____ (4) _____
Placa	(1) _____	(2) _____	(3) _____ (4) _____
Tubos	(1) _____	(2) _____	(3) _____ (4) _____
Frascos	(1) _____	(2) _____	(3) _____ (4) _____
✓ Total de Unidades Recusadas: _____		Descarte: _____ %	
✓ Abrir Rastreabilidade <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não			
Análise Crítica: _____			
✓ Alíquotas Enviadas ao LCQ: <u>06 placas + 02 frs c/4ml</u>			
✓ Total Liberado: <u>40 placas</u>			
INSPEÇÃO DE ETIQUETAS			
✓ Nome do Meio	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	
✓ Lote	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	
✓ Data de Fabricação	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	
✓ Data de Validade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	
✓ Especificação do Volume	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	
CONCLUSÃO: <input checked="" type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO			
Técnico Responsável: _____			
Data da Liberação: <u>10/08/12</u>			

2.4 Ficha de produção do meio de cultura Ágar MacConkey

2


FUNED
 Fundação
 Ezequiel Dias

TÍTULO: ÁGAR MACCONKEY - PLACAS		NÚMERO: DIOM-UHPMC-FM 0038	
Data: <u>09/08/12</u> Técnico: <u>Galvão</u> Lote UHPMC: <u>12081950-2</u>		Supervisão: <u>Amadeu</u>	
Marca: <u>Oxoid</u> Lote: <u>065877</u> Validade: <u>07/2016</u>			
FINALIDADE: Meio diferencial para isolamento de coliformes e patógenos intestinais em água, produtos lácteos e amostras biológicas. REFERÊNCIA: Manual Oxoid, 1ª edição 2000.			
INSTRUÇÕES DE PREPARO: <ul style="list-style-type: none"> • Para o preparo deste meio deve-se proceder de acordo com UHPMC – MET 0019; • Pesar e hidratar conforme instruções do fabricante; • Homogeneizar; • Verificar o pH de preparo, ajustando se necessário; • Aquecer agitando frequentemente até a completa dissolução do ágar; • Esterilizar por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos; • Resfriar rapidamente em um recipiente com água, homogeneizando sempre, observando se atingiu a temperatura adequada para distribuição (40 a 45 °C); • Identificar as placas sempre que possível; • Distribuir em placa de petri estéril evitando bolhas; • Separar uma alíquota para verificação do pH final; • Após a solidificação do meio, inverter as placas; • Manter as placas na sala de envase (dentro da cabine) para o controle visual; • Identificar e enviar amostras para o Laboratório de Controle de Qualidade; • Armazenar de acordo com o procedimento UHPMC – MET 0005. 			
Quantidade do Preparo: Volume Total: <u>1500</u> mL Cálculo(s): <u>51.5 - 1000 mL</u> <u>- 1500 mL</u> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">77,25g</div> Supervisor: <u>Albay</u>		Pesagem: Quantidade: <u>77,25</u> gramas Patrimônio da balança: <input checked="" type="checkbox"/> 2423644-6 <input type="checkbox"/> 2423645-4 <input type="checkbox"/> 14989 <input type="checkbox"/> 14910	
pH ideal: <u>7,1 ± 0,2</u> pH preparo: <u>7,10</u> pH final: <u>7,0</u> <input type="checkbox"/> Ácido Clorídrico ▼ <input checked="" type="checkbox"/> Hidróxido de Sódio ▲ Patrimônio pHmetro: <input checked="" type="checkbox"/> 2416583-2 <input type="checkbox"/> 2423547-4 <input type="checkbox"/> 3243373-5 <u>2425899-7 (Acid)</u>		Distribuição: <u>2425465-7</u> Placas: 90 x 15 mm Volume Unitário Aproximado: 23 a 25 mL Lote das placas: <u>32875</u>	
Esterilização: Ciclo <u>121°C - 15 min</u> Patrimônio da Autoclave: <input type="checkbox"/> 2423375-7 <input type="checkbox"/> 1523075-9 <input type="checkbox"/> 2411136-8 <input type="checkbox"/> Outros _____			
LIBERAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PELO CONTROLE DE QUALIDADE <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado			
Técnica Responsável: <u>UU</u>		Data: <u>13/08/12</u>	

Revisão 07 10/12/2010 Página 1 de 2

2.5 Ficha de pesagem do meio de cultura Ágar MacConkey

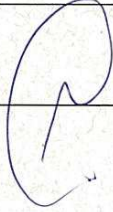


TÍTULO: ÁGAR MACCONKEY - PLACAS	NÚMERO: DIOM-UHPMC-FM 0038
--	---------------------------------------

ETIQUETA:

FUNED Fundação Ezequiel Dias
 Uso diagnostico in vitro
 Agar Mac conkey Lote 12081950 -2
 P - 09/08 12
 V - 09/09/12 Armazenar 2 a 8°C

IMPRESSÃO DE PESAGEM:

Supervisão: 

==== Relatorio de Formulacao *Neli*====
 GEHAKA *2423644_6* BK3000
 09/08/12 08:58
 Nr. de Serie = 07022301001005 *BB*
 Firmware Versao = 1.03
 Componente 1 77.25 g *Agar Macconkey*
 Peso Total 77.25 g *Neli*

Observação: *etiquetas 65 placas.*

Análise Crítica: _____

Técnico: _____

2.6 Ficha de controle visual do meio de cultura Ágar MacConkey



TÍTULO: CONTROLE VISUAL DOS MEIOS DE CULTURA		NÚMERO: DIOM-UHPMC-FM 0183		
Meio de Cultura: <u>Agar MacConkey</u>		Lote: <u>12081950-2</u>		
Data de Fabricação: <u>09/08/12</u>		Data de Validade: <u>09/09/12</u>		
Temperatura de armazenagem: <input checked="" type="checkbox"/> 2 à 8°C		<input type="checkbox"/> Temperatura Ambiente		
✓ Volume Produzido: <u>1500</u> ml = <u>60</u> unidades				
✓ Número de Unidades Produzidas: <u>56 placas + 02 frascos c/4 ml</u>				
<input type="checkbox"/> Tubos _____ mL <input checked="" type="checkbox"/> Placas _____ mL <input type="checkbox"/> Outras _____				
✓ Iniciar Rastreabilidade <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não				
Análise Crítica: _____				
PARAMETROS DO CONTROLE VISUAL				
✓ Consistência	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
✓ Volume	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
✓ Bolhas	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____	
✓ Impurezas	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____	
✓ Coloração	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
✓ Esterilidade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
✓ Precipitado	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____	
✓ Grumos	<input checked="" type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente. Quantos?	_____	
✓ Homogeneidade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
✓ Outro _____	<input type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada. Quantos?	_____	
ASPECTOS DE EMBALAGEM PRIMÁRIA				
Legenda: <input type="checkbox"/> Frouxa (1) <input type="checkbox"/> Trincado (2) <input type="checkbox"/> Quebrado (3) <input type="checkbox"/> Sujo (4)				
Tampa	(1) _____	(2) _____	(3) _____	(4) _____
Placa	(1) _____	(2) _____	(3) _____	(4) _____
Tubos	(1) _____	(2) _____	(3) _____	(4) _____
Frascos	(1) _____	(2) _____	(3) _____	(4) _____
✓ Total de Unidades Recusadas: _____		Descarte: _____ %		
✓ Abrir Rastreabilidade <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não				
Análise Crítica: _____				
✓ Aliquotas Enviadas ao LCQ: <u>06 placas + 02 frascos c/4ml</u>				
✓ Total Liberado: <u>50 placas</u>				
INSPEÇÃO DE ETIQUETAS				
✓ Nome do Meio	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	_____	
✓ Lote	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	_____	
✓ Data de Fabricação	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	_____	
✓ Data de Validade	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	_____	
✓ Especificação do Volume	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Inadequada	_____	
CONCLUSÃO: <input checked="" type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO				
Técnico Responsável: <u>R. Quart</u>				
Data da Liberação: <u>10 / 08 / 12</u>				

Simone