



Consulta Pública nº 312, de 20 de fevereiro de 2017

D.O.U de 21/02/2017

O **Diretor da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso da atribuição que lhe foi conferida pela Portaria nº 211, de 6 de fevereiro de 2017, tendo em vista o disposto no art. 44, VIII, aliado ao art. 53, III, do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo, em Anexo.

Art. 1º Fica estabelecido o prazo de 30 (trinta) dias para envio de comentários e sugestões ao texto do capítulo “Água para uso farmacêutico” da Farmacopeia Brasileira, conforme Anexo.

Parágrafo único. O prazo de que trata este artigo terá início 7 (sete) dias após a data de publicação desta Consulta Pública no Diário Oficial da União.

Art. 2º A proposta de ato normativo estará disponível na íntegra no portal da Anvisa na internet e as sugestões deverão ser enviadas eletronicamente por meio do preenchimento de formulário específico, disponível no endereço: http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=29985

§1º As contribuições recebidas são consideradas públicas e estarão disponíveis a qualquer interessado por meio de ferramentas contidas no formulário eletrônico, no menu “resultado”, inclusive durante o processo de consulta.

§2º Ao término do preenchimento do formulário eletrônico será disponibilizado ao interessado número de protocolo do registro de sua participação, sendo dispensado o envio postal ou protocolo presencial de documentos em meio físico junto à Agência.

§3º Em caso de limitação de acesso do cidadão a recursos informatizados será permitido o envio e recebimento de sugestões por escrito, em meio físico, durante o prazo de consulta, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/COFAR, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

§4º Excepcionalmente, contribuições internacionais poderão ser encaminhadas em meio físico, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Assessoria de Assuntos Internacionais (AINTE), SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária promoverá a análise das contribuições e, ao final, publicará o resultado da consulta pública no portal da Agência.

Parágrafo único. A Agência poderá, conforme necessidade e razões de conveniência e oportunidade, articular-se com órgãos e entidades envolvidos com o assunto, bem como aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para subsidiar posteriores discussões técnicas e a deliberação final da Diretoria Colegiada.

JOSÉ CARLOS MAGALHÃES DA SILVA MOUTINHO

PROPOSTAS EM CONSULTA PÚBLICA

Processo nº 25351.182036/2016-18

Assunto: Proposta de capítulo “Água para uso farmacêutico” da Farmacopeia Brasileira

Agenda Regulatória 2015-2016: Tema nº 16.1

Regime de Tramitação: Comum

Área responsável: COFAR/GGMED

11 ÁGUA PARA USO FARMACÊUTICO

Nesse capítulo são considerados como água para uso farmacêutico os diversos tipos de água empregados na síntese de fármacos; na formulação e produção de medicamentos; em laboratórios de ensaios; diagnósticos e demais aplicações, relacionadas à área da saúde, inclusive como principal componente na limpeza de utensílios, equipamentos e sistemas.

A estrutura química da água é peculiar, com um momento dipolo e grande facilidade em formar ligações de hidrogênio. Essas propriedades tornam a água um excelente meio para solubilizar, absorver, adsorver ou suspender diversos compostos, inclusive para carrear contaminantes e substâncias indesejáveis, que podem alterar a pureza e eficácia de um produto farmacêutico.

Em face de suas características, os processos de purificação; armazenamento e distribuição devem garantir que as especificações farmacopeicas sejam atendidas, mantidas e controladas adequadamente.

Os requisitos de qualidade da água dependerão de sua finalidade e emprego, e a escolha do sistema de purificação destina atender ao grau de pureza estabelecido. O usuário é responsável pela seleção do tipo de água adequado aos seus objetivos, bem como pelos controles e verificações necessários, em intervalos que garantam a manutenção da qualidade desejada. Ele deve assegurar que o sistema apresente desempenho adequado e capacidade para fornecer água com o nível de qualidade estabelecido, para atender aos parâmetros especificados nas monografias correspondentes.

Nesse capítulo não se esgota o tema e não há o propósito de substituir a legislação ou monografias oficiais já existentes sobre água para fins farmacêuticos. Tem-se como finalidade apresentar subsídios que possibilitem aos usuários um melhor entendimento de pontos fundamentais relativos à qualidade da água no momento da obtenção e durante a distribuição e uso.

O controle da contaminação da água é crucial, uma vez que a água tem grande capacidade de agregar compostos e, também, de se contaminar novamente após a purificação. Os contaminantes da água são representados por dois grandes grupos: químico e microbiológico.

Contaminantes químicos

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos têm origens diversas: da fonte de alimentação; da extração de materiais com os quais a água entra em contato; da absorção de gases da atmosfera; de resíduos poluentes, ou resíduos de produtos utilizados na limpeza e sanitização de equipamentos, dentre muitos outros. Incluem-se aqui as endotoxinas bacterianas, resultantes de micro-organismos aquáticos Gram negativos, contaminantes críticos que devem ser removidos adequadamente.

Esses contaminantes podem ser avaliados, principalmente, pelos ensaios de carbono orgânico total – COT (5.2.30) e de condutividade (5.2.24). A condutividade, medida em microsiemens/cm, é recomendada para avaliar água com grande quantidade de íons e o seu recíproco, a resistividade, em megohm.cm, é medida quando há baixa concentração de íons dissolvidos.

A maioria dos compostos orgânicos pode ser removida por osmose reversa, entretanto, aqueles com baixo peso molecular demandam técnicas adicionais, como a resina de troca iônica, carvão ativado ou oxidação por ultravioleta ou ozônio, para serem removidos.

Os limites estabelecidos para os parâmetros dos contaminantes químicos orgânicos e inorgânicos destinam-se a proteger a saúde e evitar que compostos químicos críticos possam interferir na fase de pré-tratamento dos sistemas de água, considerando que, posteriormente, podem ser de difícil remoção.

Contaminantes microbiológicos

São representados principalmente por bactérias e apresentam um grande desafio à qualidade da água. São originários da própria microbiota da fonte de água e de alguns equipamentos de purificação. Podem surgir, também, devido a procedimentos de limpeza e sanitização inadequados, que possibilitam a formação de

biofilmes e, por consequência, instalam um ciclo contínuo de crescimento a partir de compostos orgânicos que, em última análise, são os próprios nutrientes para os micro-organismos.

As bactérias podem afetar a qualidade da água por desativar reagentes ou alterar substratos por ação enzimática, aumentar o conteúdo em COT, alterar a linha de base (ruído de fundo) em análises espectrais e produzir pirogênios, como as endotoxinas.

A contagem de bactérias é reportada em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e, em geral, aumenta com o tempo de estocagem da água. Os contaminantes mais frequentes são bastonetes Gram negativos, principalmente dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e *Acinetobacter*.

O padrão microbiológico é especificado, em paralelo aos contaminantes químicos, e consiste na ausência de coliformes totais e termotolerantes (micro-organismos patogênicos de origem fecal), além de enterovírus, cistos e oocistos de protozoários, como *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em amostra de 100 mL.

Para atender a esses limites, as estações de tratamento utilizam processos de desinfecção com substâncias químicas contendo cloro ou outros oxidantes, empregadas há décadas, e consideradas relativamente seguras para os seres humanos. Entretanto, esses oxidantes podem reagir com o material orgânico de origem natural e gerar produtos secundários da desinfecção, como trihalometanos, cloraminas ou ainda deixar resíduos dos próprios desinfetantes. Esses produtos indesejáveis requerem atenção especial, por parte dos legisladores e usuários.

As cloraminas, em particular, podem danificar irreversivelmente um equipamento de declaração integrante de um sistema de purificação, além de apresentarem risco de formação e liberação de amônia.

Além desses dois grupos fundamentais de contaminantes, existem os particulados, constituídos por sílica, resíduos da tubulação ou coloides e que, além de ser um risco à qualidade da água purificada, podem provocar entupimentos e prejudicar gravemente o processo de purificação, por reduzir seu desempenho, ou até mesmo causar danos irreversíveis aos equipamentos. Podem ser detectados por filtração combinada com gravimetria ou microscopia. Em geral não é necessário identificar o tipo de partícula, apenas removê-la.

Nesse capítulo são abordadas algumas considerações acerca dos principais sistemas de purificação normalmente utilizados na produção da água para uso farmacêutico; suas principais aplicações; monitoramento e manutenção. Abrange, também, os parâmetros de pureza estabelecidos para aqueles tipos de água que não são abordados na legislação vigente.

11.1 TIPOS DE ÁGUA

Basicamente, há três tipos de água para uso farmacêutico: a água purificada (AP); a água para injetáveis (API) e a água ultrapurificada (AUP), cujas monografias encontram-se nessa Farmacopeia. Compêndios oficiais internacionais especificam, além desses, outros tipos de água, como: acondicionadas em frascos, estéreis ou bacteriostáticas, para irrigação ou inalação. Porém, todas possuem características de pureza semelhante aos tipos fundamentais já mencionados.

Além destas, há a água potável e a água reagente, que são amplamente utilizadas e têm aplicação direta em instalações farmacêuticas, principalmente em procedimentos gerais de limpeza. Assim, são considerados os cinco tipos de água a seguir, em relação às suas características principais e as sugestões de aplicação. As monografias específicas, quando disponíveis, detalham os parâmetros de pureza estabelecidos para cada tipo.

Água potável

Como diretriz fundamental, o ponto de partida para qualquer processo de purificação de água para fins farmacêuticos é a água potável. Esta é obtida por tratamento da água retirada de mananciais, por meio de processos adequados para atender às especificações da legislação brasileira relativas aos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e radioativos, para um determinado padrão de potabilidade e, portanto, não possui monografia específica nesse compêndio.

A água potável é empregada, normalmente, nas etapas iniciais de procedimentos de limpeza e como fonte de obtenção de água de mais alto grau de pureza. Pode ser utilizada, também, na climatização térmica de alguns aparatos e na síntese de ingredientes intermediários.

O controle rigoroso e a manutenção de conformidade dos parâmetros de potabilidade da água são fundamentais, críticos e de responsabilidade do usuário do sistema de purificação que será alimentado. O controle deve ser periódico para garantir que o sistema de purificação utilizado esteja apropriado para as condições da fonte de alimentação e que não houve alteração na qualidade da água fornecida. No entanto, a maioria das aplicações requer tratamentos adicionais da água potável, seja por destilação, deionização, troca iônica, osmose reversa, isolados ou acoplados, ou outro processo adequado para produzir a água purificada, livre da interferência de contaminantes que possam afetar a qualidade dos medicamentos produzidos. Outra variante da água potável é a água reagente.

Água reagente

É produzida por um ou mais processos, como destilação simples, deionização, filtração, descloração ou outro, adequados às características específicas de seu uso. Geralmente a água reagente é empregada na limpeza de materiais e de alguns equipamentos e na fase final da síntese de ingredientes ativos e de excipientes. Tem aplicação no abastecimento de equipamentos, autoclaves, banho-maria e em histologia. Devem ser adotadas medidas para evitar a proliferação microbiana nos pontos de circulação, distribuição e armazenamento. Os principais parâmetros que caracterizam a água reagente são: condutividade de 1,0 a 5,0 mS/cm (resistividade > 0,2 MW-cm) e carbono orgânico total (COT) < 0,20 mg/L. Este tipo de água não possui monografia específica e é uma variante da água potável.

Água purificada (AP)

A água purificada é produzida a partir da água potável ou da água reagente e deve atender às especificações estabelecidas na respectiva monografia. Não contém qualquer outra substância adicionada. É obtida por uma combinação de sistemas de purificação, em uma sequência lógica, tais como: múltipla destilação; troca iônica; osmose reversa; eletrodeionização; ultrafiltração, ou outro processo capaz de atender, com a eficiência desejada, aos limites especificados para os diversos contaminantes.

É empregada como excipiente na produção de formas farmacêuticas não parenterais e em formulações magistrais, desde que não haja nenhuma recomendação de pureza superior no seu uso ou que não necessite ser apirogênica. Também, pode ser utilizada na lavagem de material, preparo de soluções reagentes, meios de cultura, tampões, diluições diversas, microbiologia em geral, análises clínicas, técnicas por Elisa ou radioimunoensaio, aplicações diversas na maioria dos laboratórios, principalmente em análises qualitativas ou quantitativas menos exigentes (determinações em porcentagem). É utilizada nos ensaios e determinações que indiquem o emprego de água, a não ser que haja especificação em contrário quanto ao nível de pureza requerido, como por exemplo, alguns métodos analíticos instrumentais e análises que exijam água apirogênica ou de pureza química superior. Pode ser empregada em cromatografia a líquido de alta eficiência, quando confirmado que o seu emprego não afeta a exatidão nem a precisão dos resultados.

Dependendo da aplicação, pode ser esterilizada, sem necessariamente atingir o limite de endotoxinas bacterianas estabelecido para a *Água para Injetáveis*.

Necessita monitoramento de contagem do total de organismos aeróbicos viáveis, na produção e estocagem, visto que não possui nenhum inibidor de crescimento adicionado. Minimamente, é caracterizada por condutividade de 0,1 a 1,3 mS/cm a 25,0 °C (resistividade > 1,0 MW-cm) e COT ≤ 0,50 mg/L, endotoxinas < 0,25 UE/mL e contagem total de bactérias ≤ 100 UFC/mL, a não ser que especificado de forma diferente. Todo o sistema de obtenção, armazenamento e distribuição deve ser devidamente validado e monitorado quanto aos parâmetros de condutividade e contagem microbiana.

Ainda que seja especificada uma contagem microbiana máxima de 100 UFC/mL na monografia, cada instalação deverá estabelecer o seu limite de alerta ou de ação, caso as características específicas de utilização sejam mais restritivas.

Água ultrapurificada (AUP)

A água ultrapurificada possui baixa concentração iônica, baixa carga microbiana e baixo nível de COT. Essa modalidade de água é requerida em aplicações mais exigentes, principalmente em laboratórios de ensaios, para diluição de substâncias de referência, em controle de qualidade e na limpeza final de equipamentos e utensílios utilizados em processos que entrem em contato direto com a amostra que requeira água com esse nível de pureza. É ideal para métodos de análise que exijam mínima interferência e máxima precisão e exatidão. A utilização de água ultrapurificada em análises quantitativas de baixos teores de analito é essencial para obtenção de resultados analíticos precisos. Outros exemplos de aplicação da água ultrapurificada são: análises de resíduos, dentre eles os traços de elementos minerais, endotoxinas, preparações de calibradores, controles, substância química de referência, espectrometria de absorção atômica em geral, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometria de massa, procedimentos enzimáticos, cromatografia a

gás, cromatografia a líquido de alta eficiência (determinação de resíduos em ppm ou ppb), métodos em biologia molecular e com cultivo celular etc. Deve ser utilizada no momento em que é produzida, ou no mesmo dia da coleta.

O laboratório deve utilizar o mesmo tipo de água requerida para a leitura final da análise na preparação das amostras, na obtenção da curva padrão, de controles, preparo de soluções, brancos, lavagem final do material e em toda a vidraria que estará em contato direto com a amostra, sempre que for apropriado.

A água ultrapurificada caracteriza-se por condutividade de 0,055 a 0,1 mS/cm a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 18,0 MW-cm), COT \leq 0,05 mg/L (alguns casos \leq 0,03 mg/L), endotoxinas < 0,03 UE/mL e contagem total de bactérias \leq 10 UFC/100 mL.

Água para Injetáveis (API)

Água para Injetáveis é utilizada como excipiente na preparação de produtos farmacêuticos parenterais de pequeno e grande volume, na fabricação de princípios ativos de uso parenteral, de produtos estéreis, demais produtos que requeiram o controle de endotoxinas e não são submetidos à etapa posterior de remoção. É utilizada ainda na limpeza e preparação de processos, equipamentos e componentes que entram em contato com fármacos e medicamentos estéreis durante sua produção.

O processo de purificação de primeira escolha é a destilação, em equipamento cujas paredes internas sejam fabricadas em metal apropriado, como o aço inox AISI 316L, vidro neutro ou quartzo. Alternativamente, a API pode ser obtida por processo equivalente ou superior à destilação para a remoção de contaminantes químicos e micro-organismos, desde que seja validado e monitorado quanto aos parâmetros estabelecidos. A água de alimentação deve ser, no mínimo, potável e, em geral, necessitará ser pré-tratada para alimentar os equipamentos. O processo é assim especificado em razão da robustez que tais equipamentos apresentam quanto à operação e ao desempenho.

A água para injetáveis deve atender aos ensaios físico-químicos preconizados para a água purificada, além dos testes de contagem total de bactérias \leq 10 UFC/100 mL, esterilidade, particulados e de endotoxinas bacterianas, cujo valor máximo é de 0,25 UE/mL.

Alguns parâmetros de qualidade e sugestões de aplicações são registrados, na **Tabela 1**, para cada tipo de água para uso farmacêutico.

Tabela 1 – Tipos de água para uso farmacêutico e parâmetros de qualidade.

Tipo de água	Características	Parâmetros críticos sugeridos	Exemplos de aplicação
Água potável	Obtida de mananciais ou da rede de distribuição pública.	Possui legislação específica.	Limpeza em geral e fonte de alimentação de sistemas de tratamento.
Água reagente	Água potável tratada por deionização ou outro processo. Possui baixa exigência de pureza.	Condutividade de 1 a 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 0,2 M Ω -cm); COT < 0,20 mg/L.	Lavagem de material, abastecimento de equipamentos, autoclaves, banho-maria, histologia, usos diversos.
Água purificada	Níveis variáveis de contaminação orgânica e bacteriana. Exige cuidados de forma a evitar a contaminação química e microbiológica. Pode ser obtida por osmose reversa ou por uma combinação de técnicas de purificação a partir da água potável ou da reagente.	Condutividade de 0,1 a 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5°C (resistividade > 1,0 M Ω -cm); COT \leq 0,50 mg/L; Contagem do número total de bactérias heterotróficas: no máximo, 100 UFC/mL; Ausência de Pseudomonas e coliformes.	Produção de medicamentos e cosméticos em geral, farmácias, lavagem de material, preparo de soluções reagentes, meios de cultura, tampões, diluições, microbiologia em geral, análises clínicas, técnicas por Elisa, radioimunoensaio, aplicações diversas na maioria dos laboratórios, principalmente em análises qualitativas ou quantitativas menos exigentes (em %). Em CLAE (em %).
Água para injetáveis	Água purificada tratada por destilação ou processo similar.	Atende aos requisitos químicos da água purificada e exige controle de endotoxinas e partículas. Contagem do número total de bactérias heterotróficas: no máximo, 10 UFC/100 mL. Endotoxinas < 0,25 UE/mL. Ausência de Pseudomonas e coliformes.	Como veículo ou solvente de injetáveis, fabricação de princípios ativos de uso parenteral, lavagem final de equipamentos, tubulação e recipientes usados em preparações parenterais. Usada como diluente de preparações parenterais.
Água ultrapurificada	Para análises que exigem mínima interferência e máxima precisão e exatidão. Baixa concentração iônica, baixa carga microbiana e baixo nível de carbono orgânico total. Água purificada tratada por processo complementar.	Condutividade de 0,055 a 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 18,0 M Ω -cm); COT \leq 0,05 mg/L (alguns casos \leq 0,003 mg/L); Contagem do número total de bactérias heterotróficas: no máximo, 10 UFC/100 mL. Ausência de Pseudomonas e coliformes.	Dosagem de resíduos minerais ou orgânicos, endotoxinas, preparações de calibradores, controles, SQR, espectrometria de absorção atômica, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometria de massa, procedimentos enzimáticos, cromatografia a gás, CLAE (ppm ou ppb), biologia molecular e cultivo celular etc. Eventualmente em preparações farmacêuticas que requeiram água de alta pureza.

COT = Carbono orgânico total;

UFC = Unidades formadoras de colônias; população microbológica viável.

11.2 SISTEMAS DE PURIFICAÇÃO DE ÁGUA – TECNOLOGIAS DE PURIFICAÇÃO

Os projetos, instalações e operação de sistemas para produção de água purificada (AP), água ultrapurificada (AUP) e a água para injetáveis (API) possuem componentes, controles e procedimentos similares. A diferença reside na presença do parâmetro endotoxinas bacterianas na água para injetáveis e nos seus métodos de preparação, especificamente no último estágio. Essas similaridades de parâmetros de qualidade possibilitam estabelecer uma base comum para o projeto de sistemas destinados à obtenção de AP, AUP ou API, sendo pontos críticos diferenciais o grau de controle do sistema e os estágios finais de purificação necessários para remover bactérias, endotoxinas bacterianas e reduzir a condutividade.

Os processos de obtenção empregam operações unitárias sequenciais – os estágios de purificação – que estão voltados à remoção de determinados contaminantes e à proteção de estágios de purificação subsequentes. Note-se que a operação unitária final para obtenção de água para injetáveis é limitada à destilação ou outro processo equivalente ou superior, na remoção de contaminantes químicos, bem como micro-organismos e seus componentes. A tecnologia de destilação é consagrada pelo seu longo histórico de confiabilidade e pode ser validada para produção de água para injetáveis. Porém, outras tecnologias ou combinação de tecnologias podem igualmente ser efetivas e validadas para essa finalidade. A ultrafiltração colocada em uma sequência após outras tecnologias de purificação de contaminantes químicos pode ser adequada para a produção de água para injetáveis, se demonstrar a mesma eficácia e confiabilidade da destilação na validação.

Para produzir a água para injetáveis, há novas e promissoras aplicações validáveis devido ao desenvolvimento de novos materiais para tecnologias como osmose reversa e ultrafiltração, que permitem operar e sanitizar em temperatura mais elevada, possibilitando uma redução microbiana mais efetiva.

O projeto de instalação de um sistema de purificação de água deve considerar a qualidade da água de fornecimento e da água desejada ao final, a vazão necessária, a distância entre o sistema de produção e os pontos de uso, o traçado da tubulação e conexões, o material empregado, facilidades de assistência técnica e manutenção e os instrumentos adequados para o monitoramento.

As tecnologias de purificação destinam-se à remoção de contaminantes nos diversos estágios da sequência de purificação. As principais tecnologias apresentadas a seguir estão em uma ordem sequencial lógica, porém a escolha de quais serão utilizadas e a ordem em que são aplicadas dependerão da qualidade da água potável de entrada e do tipo de água que se busca obter.

Pré-filtração

Também conhecida como filtração de profundidade ou filtração inicial, destina-se a remover contaminantes particulados na faixa de tamanho entre 5 e 10 μm , essencialmente para proteger as tecnologias subsequentes, utilizando filtros de areia ou combinação de filtros.

Adsorção por carvão vegetal ativado

Essa tecnologia emprega a capacidade de adsorção do carvão vegetal ativado em contato com compostos orgânicos ou contaminantes, como as cloraminas. Além disso, remove agentes oxidantes por redução química, em especial o cloro livre, que afeta outras tecnologias baseadas em membrana, como a osmose reversa ou a ultrafiltração.

A retirada de agentes sanitizantes propicia o crescimento bacteriano e a formação de biofilme, o que implica na necessidade de sanitização do próprio carvão ativado, com vapor direto ou água quente, por exemplo, e do controle de partículas e contagem microbiana de seu efluente.

Tratamento com aditivos químicos

O uso de aditivos químicos refere-se àqueles que se destinam a ajustar o pH ou a remover carbonatos e amônia, para a proteção de outras tecnologias, entre elas a osmose reversa.

Como aditivos químicos podem ser empregados o ozônio, comumente usado no controle de micro-organismos, e o metabissulfito, aplicado como agente redutor para cloro livre, em substituição ao carvão vegetal ativado.

Os aditivos químicos são, necessariamente, removidos em algum estágio posterior de purificação e não podem deixar resíduo na água final.

Tratamento com abrandadores

Nos casos em que a água de alimentação é “dura”, torna-se necessário usar os abrandadores. Essa tecnologia emprega resinas regeneráveis de troca iônica, que capturam os íons cálcio e magnésio, e liberam íons sódio na água. O abrandamento é utilizado na proteção de tecnologias sensíveis à incrustação, como a osmose reversa.

É necessário controlar a contagem microbiana, com regeneração frequente, recirculação ou outras formas de redução de contagem microbiana, para evitar a formação de biofilme.

Deionização e eletrodeionização contínua

A deionização e a eletrodeionização contínua são tecnologias eficazes para a remoção de sais inorgânicos dissolvidos. Os sistemas de deionização, também conhecidos como deionização convencional, produzem água purificada de uso rotineiro, por meio de resinas de troca iônica específicas para cátions ou para ânions. São polímeros orgânicos, geralmente sulfonados, na forma de pequenas partículas. As resinas catiônicas capturam os íons liberando o íon H^+ na água e as aniônicas liberam OH^- . São regeneráveis com ácidos e bases, respectivamente. Esse processo isolado não produz água de alta pureza, por haver fuga de pequenos fragmentos da resina, facilidade de crescimento microbiano e por haver baixa remoção de orgânicos.

Os sistemas de eletrodeionização contínua combinam resinas catiônicas e aniônicas com membranas semipermeáveis e a aplicação de um campo elétrico, promovendo a remoção de íons de forma contínua, isto é, sem necessidade de parada para regeneração. Em ambos os casos é necessário ter um controle sobre a geração de partículas decorrente das regenerações sucessivas, além de micro-organismos. Isso pode ser realizado controlando-se as regenerações, no caso da deionização, utilizando-se recirculação da água e aplicando-se radiação UV para o controle de micro-organismos na saída, cuja eficácia precisa ser comprovada.

Osmose reversa

A osmose reversa é uma tecnologia de purificação baseada em membranas semipermeáveis e com propriedades especiais de remoção de íons; micro-organismos e endotoxinas bacterianas. Remove 90 a 99% da maioria dos contaminantes. Entretanto, diversos fatores, como pH; pressão diferencial ao longo da membrana; temperatura; tipo do polímero da membrana e a própria construção dos cartuchos de osmose reversa podem afetar significativamente essa separação.

As membranas de osmose reversa devem ser devidamente controladas quanto à formação de incrustações provenientes de sais de cálcio, magnésio e outros, e de biofilme, fonte crítica de contaminação microbiana e de endotoxinas. Por isso é imprescindível instalar um sistema de pré-tratamento antes da osmose reversa, que remova partículas e agentes oxidantes, e, em paralelo, deve-se fazer, periodicamente, a sanitização do sistema. Essa prática ajuda a aumentar a vida útil das membranas e reduz a frequência de sua regeneração.

Existem os sistemas de osmose reversa de duplo passo, em que a água purificada pelo primeiro estágio alimenta o segundo estágio, incrementando e complementando a purificação.

Ultrafiltração

A ultrafiltração é frequentemente utilizada em sistemas de água para uso farmacêutico para a remoção de endotoxinas. A ultrafiltração é realizada utilizando-se uma membrana especial com a propriedade de reter moléculas conforme o seu peso molecular e estereoquímica. Denomina-se de Corte Nominal de Peso Molecular “*cut off*” a faixa utilizada para a separação das partículas, caracterizado pelo tamanho do peso molecular. Na remoção de endotoxinas são utilizados filtros na faixa de 10 000 Da, que retêm moléculas com massa molecular, maior ou igual a 10 000 Da.

Essa tecnologia pode ser usada em uma etapa final ou intermediária do sistema de purificação, desde que validada, e, da mesma forma que a osmose reversa, requer um pré-tratamento, um controle adequado das condições operacionais e procedimentos apropriados de limpeza e sanitização, para manter a qualidade da água conforme o estabelecido.

Filtração com carga eletrostática

Esse tipo de filtração emprega cargas positivas na superfície das membranas e destina-se a reduzir os níveis de endotoxinas que possuem natureza elétrica negativa. Apresentam uma capacidade marginal de remoção de micro-organismos, porém sua maior eficiência é devido à remoção de endotoxinas. Apresenta uma limitação importante: quando as cargas estão totalmente neutralizadas, por saturação pela captura das endotoxinas, a remoção se paralisa. Por essa razão, filtros com carga eletrostática são extremamente difíceis de validar, dada essa imprevisibilidade, quanto ao momento em que efetivamente não mais retêm esses contaminantes.

Microfiltração – retenção de micro-organismos

Essa tecnologia utiliza membranas microporosas, com uma especificação de tamanho de poro de 0,2 ou 0,22 μm . Devem ser validadas quanto à retenção, por meio de um teste bacteriológico, que determina o valor da redução logarítmica dos micro-organismos nas membranas. O modelo usado emprega uma suspensão de *Brevundimonas diminuta* a 10^7 UFC/cm² de área filtrante e testa a esterilidade do filtrado. Ainda que a membrana seja especificada como 0,2 ou 0,22 μm de diâmetro de poro, não necessariamente será esterilizante se não produzir um filtrado estéril por meio desse teste, ou seja, um valor de redução logarítmica igual a 7. Caso a redução logarítmica obtida não seja da ordem de sete, a membrana pode ser utilizada para reduzir a contagem microbiana, porém não deve ser utilizada para esterilizar.

A microfiltração é aplicada na filtração de gases, ou ventilação de tanques de armazenamento, para evitar contaminação da água neles contida. Nesses casos, utilizam-se membranas hidrofóbicas, para que o filtro opere sem acúmulo de água condensada, a partir da umidade do próprio ar.

Radiação ultravioleta (UV)

A radiação UV é utilizada em sistemas de purificação de água em dois comprimentos de onda: 185 nm e 254 nm, que promovem dois efeitos:

- 185 nm e 254 nm – Oxidação de compostos orgânicos e consequente redução de sua concentração, para atender aos limites da AP, AUP e API;
- 254 nm – Ação germicida nos diversos pontos da sequência de purificação, para reduzir a contagem microbiana.

Para a oxidação de orgânicos a água deve estar no estágio final da purificação e essa remoção será mais efetiva quanto menor for a carga de contaminantes. Outra limitação é a presença de partículas que podem depositar-se na superfície da lâmpada, diminuindo a intensidade da radiação e prejudicar a eficiência do método. Deve-se considerar ainda a profundidade / espessura do leito de água, o fluxo de água no local da radiação e a potência e tempo de uso da fonte de radiação.

Destilação

Em instalações industriais pode haver destiladores simples, de múltiplos efeitos e os de compressão de vapor, que são usados, em geral, para sistemas de produção de grandes volumes. A água de alimentação para esses equipamentos requer controles diferentes daqueles usados em osmose reversa. Nesse caso, a concentração de silicatos é crítica, como em qualquer sistema de geração de vapor. Outro aspecto importante é a possibilidade de carreamento de compostos voláteis no condensado. Isso é especialmente importante no que se refere a impurezas orgânicas, como trihalometanos e gases dissolvidos na água, como dióxido de carbono e amônia. Assim, é fundamental o controle da água potável de entrada, conforme mencionado sobre a água de alimentação para sistemas de purificação.

11.3 DISTRIBUIÇÃO, SANITIZAÇÃO, ARMAZENAMENTO E VALIDAÇÃO

Distribuição

O desenho do sistema de distribuição deve levar em consideração a recirculação constante da água purificada e a manutenção da temperatura da água contida no tanque. Caso necessário, deverá conter um trocador de calor para fornecer água mais fria aos pontos de uso.

Tubulações, válvulas, instrumentos e outros dispositivos devem ter construção e acabamento sanitário, de forma a não contribuírem para que ocorra a contaminação microbiana e serem sanitizados.

Não devem ser utilizados filtros de retenção microbiológica na saída, ou no retorno dos sistemas de distribuição, pois são repositórios de micro-organismos retidos e, portanto, uma fonte crítica para a formação de endotoxinas. Os pontos de uso devem ser projetados de forma a evitar volumes mortos e possibilitar que a água recircule totalmente neles quando estiverem fechados.

Sanitização

Diversos são os métodos de sanitização dos sistemas de produção, armazenamento e distribuição.

O material de construção do sistema deve ser resistente aos agentes empregados e a temperatura utilizada no processo é crítica. É comum utilizar temperaturas de 80 °C ou de 65 °C, com circulação contínua da água. No entanto, para impedir a formação de biofilmes normalmente é empregada uma combinação de calor e agentes químicos na sanitização. O procedimento de sanitização deve ser devidamente validado.

Como agentes químicos, geralmente são usados oxidantes, como os compostos halogenados, peróxido de hidrogênio, ozônio ou uma combinação desses. A frequência da sanitização é determinada pelo histórico dos resultados do monitoramento e das curvas de tendência, de forma que o sistema funcione sem exceder o limite de alerta.

Armazenamento

As condições de estocagem devem ser adequadas à qualidade da água. A água ultrapurificada não deve ser armazenada por período superior a 24 horas. A diretriz fundamental para o armazenamento da água purificada, da água ultrapurificada ou da água para injetáveis é ponderar que, quanto maior o grau de purificação da água, mais rapidamente ela tende a se recontaminar.

Sendo assim, a água deve ser mantida em recirculação constante, por meio de seu sistema de distribuição, sempre que aplicável. As primeiras porções de água produzida por um sistema de purificação que tenha ficado inativo por mais de quatro horas devem ser desprezadas proporcionalmente ao volume morto do recipiente. Essas variáveis devem ser validadas para as condições específicas de cada sistema bem como devem ser estabelecidos os parâmetros a serem considerados na validação.

O reservatório utilizado para a sua manutenção deve ser apropriado aos fins a que se destina, sendo composto por material inerte, limpo e não servir de fonte de contaminação ao conteúdo. O material de construção deve apresentar características e rugosidade apropriadas para dificultar a aderência de resíduos, a formação de biofilme e a corrosão pelos agentes sanitizantes. O aço inoxidável 316L eletropolido, com rugosidade menor que 0,5 microRA, é a escolha mais frequente para atender a essas exigências. O reservatório deve estar protegido de fontes de luz e calor impróprios e a geometria deve permitir seu esgotamento total pelo fundo, sem volumes mortos.

Procedimentos adequados devem ser adotados para evitar a contaminação por particulados, orgânicos ou micro-organismos. Deve possuir um filtro de "respiro"/ventilação para evitar que haja contaminação do volume do tanque pela admissão de ar/umidade contaminados e evitar uma recontaminação por essa via.

Em particular, mas não exclusivamente, reservatórios de água para injetáveis devem ser encamisados para manter a água circulante em temperatura superior a 80° C, o que restringe significativamente o crescimento bacteriano.

Validação

O propósito fundamental da validação é assegurar a confiabilidade de um sistema de purificação de água, envolvendo sua obtenção, armazenamento, distribuição e qualidade no ponto de uso.

A validação inclui a qualificação do projeto (QP); da instalação (QI); da operação (QO) e do desempenho (QD).

O plano de validação para um sistema de água envolve as seguintes etapas:

a) conhecer o padrão de qualidade da fonte de alimentação;

- b) estabelecer o padrão de qualidade da água purificada;
- c) definir as tecnologias de purificação e sua sequência, a partir da qualidade da água de entrada;
- d) selecionar os materiais de construção dos sistemas de produção, armazenamento, distribuição e monitoramento dos pontos de uso;
- e) desenvolver os protocolos de qualificação de projeto, instalação, operação e desempenho;
- f) estabelecer os parâmetros críticos, níveis de alerta e de ação e a periodicidade de sanitização e de monitoramento;
- g) estabelecer um plano de manutenção da validação, que incluirá mecanismos para o controle de mudanças nos sistemas de água e proporcionará subsídios para um programa de manutenção preventiva.

Os protocolos de qualificação devem estar previamente aprovados antes de sua execução.

11.4 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA

O processo empregado na produção de água para uso farmacêutico deve ser validado e, sistematicamente, os parâmetros estabelecidos na legislação e nas monografias específicas de cada tipo de água devem ser verificados.

O monitoramento da qualidade da água deve abranger todos os pontos críticos e representativos do sistema, de acordo com o planejamento estabelecido, de forma consistente e contínua.

Assim, devem ser estabelecidos procedimentos operacionais e de sanitização, um programa de monitoramento abrangente, com manutenção preventiva e um sistema de controle de mudanças, que determine criteriosamente se o sistema necessitará ser revalidado após qualquer modificação. As questões sazonais que podem afetar a qualidade da água da fonte de fornecimento devem ser consideradas na elaboração do plano. A frequência de coleta das amostras é definida na validação do sistema, bem como os ensaios necessários para garantir a manutenção da qualidade da água requerida. Qualquer alteração no plano original deve ser reavaliada.

Os equipamentos e aparatos utilizados nas verificações devem ser capazes de fornecer a leitura na faixa requerida para a pureza estabelecida. Os equipamentos utilizados devem estar devidamente calibrados. As verificações realizadas devem ser registradas em formulário próprio, em que conste, pelo menos, o(s) parâmetro(s) medido(s), a data da medição, o valor obtido, a faixa de aceitação e o responsável pela leitura. O pessoal que realiza essa tarefa deve conhecer o plano de amostragem e os métodos utilizados, bem como os limites de alerta e de ação estabelecidos. Caso o usuário terceirize esse controle, deve garantir que o terceirizado cumpra com os requisitos e procedimentos definidos.

Os dados obtidos são comparados com as especificações típicas e os limites de alerta e de ação. Esses são estabelecidos pelo usuário, com base nos dados da validação, no histórico do sistema de purificação e distribuição e nas exigências de qualidade para uma determinada aplicação.

O usuário deve definir os limites de alerta e de ação, de forma a evitar a obtenção do produto com especificação de qualidade inferior à requerida para uma dada aplicação. O limite de alerta indica que um desvio na qualidade pode acontecer e não necessariamente requer uma medida corretiva. Pode ser estabelecido com base em uma análise estatística do histórico de tendências, utilizando dois desvios-padrão, por exemplo, ou cerca de 70% do limite de ação, ou 50% da contagem do número de unidades viáveis, o que for menor. O limite de ação indica que o desvio da qualidade excedeu os parâmetros toleráveis e requer interrupção da atividade para a correção.

O monitoramento da qualidade da água deve ser realizado por meio de análises físico-químicas e microbiológicas.

11.4.1 MONITORAMENTO FÍSICO-QUÍMICO

O monitoramento físico-químico acompanha, principalmente, a condutividade e o carbono orgânico total, que também podem ser medidos em linha. Esses ensaios abrangem um grande número de contaminantes inorgânicos. Caso a amostra não seja analisada em seguida à coleta, deve ser preservada e armazenada

em condições que garantam a sua integridade e conservação por período adequado. Dependendo da aplicação requerida os parâmetros críticos a serem monitorados podem variar.

11.4.2 MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO

A importância do controle da água para uso farmacêutico está em garantir sua qualidade de modo a atender aos parâmetros determinados em cada monografia e evitar o carreamento da contaminação para os produtos. Sendo assim, requer rigoroso controle de qualidade microbiológico, visto que, por suas características intrínsecas e pelos processos envolvidos na sua produção, é altamente suscetível à contaminação microbiana.

O alvo do controle microbiológico são as bactérias patogênicas, existindo a necessidade de identificar ou selecionar certas espécies de micro-organismos que podem ser prejudiciais a processos e produtos, como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

11.4.2.1 Amostragem

A amostragem é uma etapa importante na avaliação da qualidade da água, uma vez que a amostra retirada para análise deve refletir com precisão o desempenho do sistema de produção e distribuição e a qualidade da água utilizada. Uma amostragem inadequada pode levar a uma avaliação equivocada, gerando intervenções desnecessárias no sistema de purificação, ou comprometendo a veracidade do estado da qualidade da água por meio de um resultado impreciso.

Considerando as particularidades de cada sistema, as amostras de água devem ser retiradas desde o local de sua geração até os pontos de uso, visto que os resultados obtidos na geração podem não refletir a qualidade da água nos pontos de uso.

A coleta de amostras nos pontos de uso deve ser realizada utilizando práticas idênticas àquelas empregadas rotineiramente na utilização da água naquele ponto, para imitar a operação de uso (purga da válvula, utilização de mangueiras, sanitização do ponto, etc).

O plano de amostragem inicial é normalmente desenvolvido para um programa de validação do sistema de produção de água para uso farmacêutico, a fim de caracterizar a sua capacidade de purificação, distribuição e fornecimento de água. O plano de amostragem é de curta duração (por exemplo, de duas a quatro semanas) e determina uma frequência elevada de coleta de amostras, a fim de gerar um volume significativo de dados, que proporcione uma avaliação inicial do desempenho do sistema, para orientar as decisões sobre o uso da água produzida.

O plano de amostragem inicial é reavaliado quando o sistema é colocada em operação, geralmente para buscar a redução da quantidade de dados que está sendo gerada sem comprometer a capacidade de identificar operações/eventos anômalos, especialmente durante a fase inicial do ciclo de vida do sistema de água. Na ausência de tais desvios de qualidade durante o período de amostragem inicial, a frequência de amostragem pode ser reduzida para garantir que em um prazo um pouco mais longo (por exemplo, por pelo menos, mais 2-4 semanas), não ocorram tendências adversas da qualidade. Durante este período de tempo de validação do segundo plano de amostragem, o uso da água na rotina pode ser considerado um risco. Após a conclusão da avaliação, se bem-sucedida, o monitoramento pode, eventualmente, ser reduzido novamente para o plano de amostragem que será adotado na rotina.

Periodicamente, é necessário revisar a operação e o monitoramento do sistema para avaliar a variabilidade sazonal da fonte de água, a eficácia da sanitização e os eventos de manutenção de rotina. Essa revisão deve ser realizada durante o ciclo completo de vida do sistema de produção de água, normalmente anualmente, para evidenciar tendência de desvios da qualidade dos dados de longo prazo.

O plano de amostragem adotado na rotina também deve ser reavaliado periodicamente, com base nos dados disponíveis, para reavaliar a frequência e os locais de amostragem adequados. Esta etapa oferece uma oportunidade para melhorar a avaliação dos dados e reduzir as cargas de trabalho com base no que os dados indicam sobre o processo e o controle de qualidade. O plano de amostragem adotado na rotina deve ter uma base racional para a frequência e locais de amostragem estabelecidos, a fim de justificar como os dados resultantes serão utilizados para caracterizar a operação geral do sistema e para a liberação da água para uso.

As amostras devem ser coletadas em recipientes de vidro borossilicato estéreis ou bolsas plásticas esterilizadas apropriadas para o uso microbiológico. O volume da amostra deve ser suficiente para realizar todas as análises necessárias. A quantidade de amostra adicionada nos recipientes deve permitir a homogeneização antes da realização dos ensaios, sendo preconizado um espaço de pelo menos 2,5 cm acima da superfície da água (*headspace*).

Agentes desinfetantes, como cloro ou outros compostos halogenados, quando presentes nas amostras de água, devem ser neutralizados antes da realização dos testes, para garantir uma recuperação adequada dos micro-organismos possivelmente presentes. Um agente neutralizante comumente usado é a solução de tiosulfato de sódio (0,1 mL de uma solução a 3% neutraliza acima de 5 mg/L de cloro residual em uma amostra de 120 mL).

Resultados não conformes requerem uma intervenção extraordinária no local, em adição às operações normais, a fim de restaurar o sistema para que o padrão de qualidade esperado seja mantido.

11.4.2.2 Condições de armazenamento

Os testes devem ser realizados na amostra em até duas horas após a coleta e, caso não seja possível proceder ao teste neste intervalo, a amostra deve ser mantida em temperatura de refrigeração na faixa de 2 a 8 °C por, no máximo, 12 horas para manter as características microbiológicas até a análise. Em situações em que nem mesmo isso seja possível (tais como quando se utiliza laboratórios contratados fora do local), o ensaio dessas amostras refrigeradas deve ser realizado dentro do período de 24 horas após a coleta.

11.4.2.3 Meios de cultura

Ágar caseína-soja

Peptona de caseína pancreática	15,0 g
Farinha de soja obtida por digestão papaínica	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,3 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar endo C

Hidrolisado péptico de tecido animal	10,0 g
Lactose	10,0 g
Fosfato dibásico de potássio	3,5 g
Sulfito de sódio	2,5 g
Fucsina básica	0,5 g
Ágar	15,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,4 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar eosina azul de metileno

Hidrolisado pancreático de gelatina	10,0 g
Lactose	5,0 g
Sacarose	5,0 g
Fosfato dibásico de potássio	2,0 g
Ágar	13,5 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,2 + 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar M-Pa-C

L-lisina	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Xilose	1,25 g
Sacarose	1,25 g
Lactose	1,25 g
Vermelho de fenol	0,08 g
Citrato de amônio e ferro III	0,8 g
Sulfato de magnésio	1,5 g
Ágar	12,0 g
Tiosulfato de sódio	5,0 g
Canamicina	8,0 mg
Ácido nalidíxico	37,0 mg
Água purificada estéril q.s.p.	1000 mL

pH 7,1 ± 0,2. Não autoclavar. Ferver o meio por um minuto. Determinar o prazo de validade do meio preparado.

Ágar MacConkey

Hidrolisado pancreático de gelatina	17,0 g
Hidrolisado pancreático de caseína	1,5 g
Hidrolisado péptico de tecido animal	1,5 g
Lactose	10,0 g
Sais biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Ágar	13,5 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,1 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar m-HPC

Peptona	20,0 g
Gelatina	25,0 g
Glicerol	10,0 mL
Ágar	15,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

Misturar todos os ingredientes, exceto o glicerol. Ajustar o pH para 7,1 ± 0,2, aquecer para dissolver e adicionar o glicerol. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar para contagem em placa (plate count agar - PCA)

Peptona de caseína	5,0 g
Extrato de levedura	2,5 g
Glicose	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,0 ± 0,1. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar R2A

Peptona (caseína ou tecido animal)	0,5 g
Ácido Casamino	0,5 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Piruvato de Sódio	0,3 g
Glicose	0,5 g

Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,05 g
Amido solúvel	0,5 g
Fosfato de Hidrogênio Dipotássico	0,3 g
Ágar	15,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,2 ± 0,1. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Caldo EC ou EC-MUG

Triptose ou tripticase	20,0 g
Lactose	5,0 g
Mistura de sais biliares	1,5 g
Fosfato de hidrogênio dipotássico	4,0 g
Fosfato de dihidrogênio potássico	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
4-metil-umbeliferil-β-D-glicoronídeo (MUG)	0,05 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 6,9 ± 0,2. Antes da esterilização, dispensar em tubos que não apresentem fluorescência em altos comprimentos de onda da luz UV (366 nm). Não é necessário tubo de Durham. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Caldo lactose bile verde brilhante

Peptona	10,0 g
Lactose	10,0 g
Oxgall	20,0 g
Verde brilhante	0,0133 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 7,2 ± 0,2. Antes da esterilização, colocar um tubo de Durham invertido em cada tubo de ensaio para detectar a produção de gás. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Caldo lauril triptose

Triptose	20,0 g
Lactose	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,75 g
KH ₂ PO ₄	2,75 g
NaCl	5,0 g
Lauril sulfato de sódio	0,1 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL

pH 6,8 ± 0,2. Antes da esterilização, colocar um tubo de Durham invertido em cada tubo de ensaio para detectar a produção de gás. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

11.4.2.4 Contagem do número total de bactérias heterotróficas

Os métodos apresentados são opcionais e podem ou não ser ideais para a recuperação dos micro-organismos, incluindo aqueles indesejáveis. A escolha deverá ser efetuada por meio de experimentos, determinando-se quais são os métodos adequados para o monitoramento de seu processo, como para a recuperação dos micro-organismos específicos que podem ser encontrados nos sistemas de purificação de água e que podem ser indesejáveis para os produtos a serem manipulados.

Existem duas categorias de meios de cultura para a contagem do número total de bactérias heterotróficas: os com alta concentração de nutrientes, tendo como exemplos o ágar para contagem em placa (*plate count agar* - PCA), ágar caseína-soja e o ágar m-HPC, sendo adequados para isolamento geral e enumeração de

bactérias heterotróficas ou copiotróficas, e os de baixa concentração de nutrientes, como o ágar R2A, o qual é indicado para recuperação de bactérias oligotróficas.

A temperatura e tempo de incubação são aspectos críticos para os testes microbiológicos da água, devido aos tipos de micro-organismos encontrados nos sistemas de água. Incubações a baixas temperaturas (por exemplo, de 20 a 25 °C ou de 25 a 30 °C) por períodos mais longos, por pelo menos quatro dias, podem levar a recuperações mais altas de micro-organismos, do que as temperaturas clássicas. Os meios com baixa quantidade de nutrientes requerem períodos de incubação mais longos (pelo menos cinco dias), pois esses meios promovem crescimento mais lento. Mesmo aqueles com alta concentração de nutrientes podem algumas vezes resultar em alta recuperação microbiana por longos períodos de incubação e temperaturas mais baixas.

A decisão sobre o tipo de meio de cultura e a temperatura de incubação para se testar um sistema de purificação de água deve ser baseada em estudos comparativos de cultivo usando um microbioma nativo dos sistemas de purificação da água em análise.

PROCEDIMENTO

Método por profundidade em placa

Adicionar 1 mL da amostra em placa de Petri e verter 15 a 20 mL do meio de cultura mantido de 45 a 50 °C, conforme **Tabela 2**. Realizar o teste pelo menos em duplicata.

Método de filtração em membrana

Utilizar equipamento de filtração que possibilite a transferência da membrana para os meios de cultura. Utilizar membrana estéril com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, lavando-se a membrana, após a filtração da amostra, com três porções de 20 a 30 mL de água purificada estéril. O volume a ser filtrado poderá variar de acordo com a amostra obedecendo a um volume máximo que forneça de 20 a 200 UFC por membrana.

Tabela 2 - Condições para contagem do número total de bactérias heterotróficas.

Método	Tipos de água		
	Água potável	Água purificada	Água para injetáveis e água ultrapurificada
Tipo de método	Profundidade em placa ou Filtração em Membrana	Profundidade em placa ou Filtração em Membrana	Filtração em Membrana
Tamanho sugerido da amostra ^a	1,0 mL/100 mL ^b	1,0 mL/100 mL ^b	200,0 mL
Meio ^c	Ágar R2A, PCA	Ágar R2A, PCA	Ágar R2A, PCA
Período de incubação	Ágar R2A: 4-7 dias (ou mais longo) PCA: 48-72 horas (ou mais longo)	Ágar R2A: 4-7 dias (ou mais longo) PCA: 48-72 horas (ou mais longo)	Ágar R2A: 4-7 dias (ou mais longo) PCA: 48-72 horas (ou mais longo)

Temperatura de incubação	Ágar R2A: 20-25 °C ou 30-35 °C PCA: 30-35 °C	Ágar R2A: 20-25 °C ou 30-35 °C PCA: 30-35 °C	Ágar R2A: 20-25 °C ou 30-35 °C PCA: 30-35 °C
--------------------------	--	--	--

^a O tamanho da amostra deve ser apropriado para a esperada contagem microbiana da água para se obter contagens de colônias estatisticamente válidas.

^b 1,0 mL para profundidade em placa e 100,0 mL para filtração em membrana.

^c Para otimizar a recuperação, um meio alternativo pode ser mais adequado (m-HPC, ágar Caseína-soja).

11.4.2.5 Pesquisa de coliformes totais e fecais

O grupo coliforme consiste de várias bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae. A histórica definição desse grupo foi baseada no método utilizado para detecção: fermentação da lactose em detrimento dos princípios da bacteriologia sistemática. Por conseguinte, quando a técnica de fermentação é utilizada, esse grupo é definido como anaeróbicos facultativos, bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos e fermentadores da lactose com formação de gás e ácido quando incubados por 48 horas a 35 °C. O teste padrão para o grupo coliforme pode ser conduzido pelos seguintes métodos: fermentação em tubos múltiplos, filtração em membrana ou cromogênico.

Para todos os tipos de água para uso farmacêutico, independentemente do método utilizado, coliformes totais e fecais devem estar ausentes.

PROCEDIMENTO

Método de fermentação em tubos múltiplos

Fase presuntiva - Usar Caldo lauril triptose. Se o meio for refrigerado após a esterilização, deixar em temperatura ambiente antes do uso. Descartar os tubos que apresentarem crescimento ou bolhas. Preparar o Caldo lauril triptose em uma concentração tal que, ao adicionar 100 mL, 20 mL ou 10 mL da amostra ao meio, a concentração dos ingredientes da fórmula não será reduzida, como descrito na **Tabela 3**. Garantir que os tubos de Durham invertidos estejam livres de bolhas.

Tabela 3 – Preparo do Caldo lauril triptose.

Amostra (mL)	Quantidade de meio/tubo (mL)	Volume de meio + amostra (mL)	Caldo lauril triptose requerido (g/L)
1	10 ou mais	11 ou mais	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

Agitar a amostra vigorosamente. Usar cinco porções de 20 mL, 10 porções de 10 mL ou uma amostra única de 100 mL. Misturar as porções da amostra no meio agitando levemente. Incubar a 35 °C ± 0,5 °C. Após 24 ± 2 horas, agitar cada tubo levemente e observar a presença de crescimento ou formação de gás e, se nenhum gás for evidente, reincubar os tubos e reexaminar ao final de 48 ± 3 horas. Registrar a presença ou ausência de crescimento e gás. A turvação ou produção de gás nos tubos dentro de 48h ± 3 horas constitui uma reação presuntiva positiva. Nesse caso, prosseguir com a fase confirmatória.

Fase confirmatória - Usar Caldo lactose bile verde brilhante. Garantir que os tubos de Durham invertidos estejam livres de bolhas. Agitar levemente os tubos de fermentação do Caldo lauril triptose positivos e inocular uma ou mais alçadas da cultura em Caldo bile lactose verde brilhante. Incubar os tubos de Caldo bile lactose verde brilhante a 35 °C ± 0,5 °C. O crescimento e formação de qualquer quantidade de gás dentro de 48 ± 3 horas constitui uma fase confirmatória positiva, indicando a presença de coliformes totais.

Para estimar a densidade de coliformes, calcular o número mais provável (NMP) a partir do número de tubos positivos do Caldo bile lactose verde brilhante (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Índice do NMP e limites de 95% de confiança para todas as combinações de resultados positivos e negativos quando são usadas cinco porções de 20 mL da amostra.

Nº de tubos com resultado positivo (20 mL de amostra cada)	Índice de NMP/100 mL	95% de limite de confiança (exato)	
		Baixo	Alto
0	< 1,1	-	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,40	8,4
3	4,6	1,0	13
4	8,0	2,1	23
5	> 8,0	3,4	-

Tabela 5 - Índice do NMP e limites de 95% de confiança para todas as combinações de resultados positivos e negativos quando são usadas 10 porções de 10 mL da amostra.

Nº de tubos com resultado positivo (10 mL de amostra cada)	Índice de NMP/100 mL	95% de limite de confiança (exato)	
		Baixo	Alto
0	< 1,1	-	3,4
1	1,1	0,051	5,9
2	2,2	0,37	8,2
3	3,6	0,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	6,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12	4,8	24
8	16	5,8	34
9	23	8,1	53
10	>23	13	-

Fase completa - Agitar levemente os tubos de fermentação do Caldo bile lactose verde brilhante positivos e inocular uma ou mais alçadas da cultura no Caldo EC ou EC-MUG. Alternativamente, a inoculação no Caldo EC ou EC-MUG pode ser feita a partir da cultura em Caldo lauril triptose simultaneamente à inoculação em Caldo bile lactose verde brilhante na fase confirmatória. Incubar os tubos de EC ou EC-MUG à temperatura de $44 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

A observação de crescimento e produção de gás nos tubos de EC ou EC-MUG indica a presença de coliformes fecais ou *E. coli*, respectivamente. Paralelamente, culturas positivas de Caldo bile lactose verde brilhante com resultados negativos nos Caldos EC ou EC-MUG indicam a presença de coliformes não fecais.

Testes confirmatórios utilizando meios seletivos e diferenciais e testes bioquímicos para identificação das espécies podem ser realizados quando necessário.

Método de filtração em membrana

Utilizar equipamento de filtração que possibilite a transferência da membrana para os meios de cultura. Utilizar membrana estéril com 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm, lavando-se a membrana, após a filtração da amostra, com três porções de 20 a 30 mL de água purificada estéril. O volume a ser filtrado poderá variar de acordo com a amostra obedecendo a um volume máximo que forneça de 20 a 200 UFC por membrana. Para pesquisa de coliformes, a membrana deve ser incubada em meio específico (por exemplo, MacConkey, endo C, eosina azul de metileno, etc), às temperaturas preconizadas para as pesquisas de coliformes totais e fecais por 24 horas.

Método cromogênico

Meios de cultura contendo na sua formulação substratos enzimáticos específicos possibilitam melhorias significativas na recuperação dos micro-organismos e na identificação dos mesmos.

No caso da pesquisa de coliformes totais e de *E. coli*, há métodos alternativos que se correlacionam com os métodos tradicionais de filtração em membrana e de tubos múltiplos. Existem testes baseados na utilização de um substrato específico, que permitem a pesquisa simultânea de coliformes totais e de *E. coli* em menor tempo. Por exemplo, testes baseados na atividade da β-galactosidase sobre o substrato ONPG (O-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) e da β-D-glicuronidase sobre o substrato MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo). O teste baseia-se na adição de 100 mL de amostra aos substratos e incubação a 35-37°C por 24 horas. A atividade dos coliformes totais sobre o substrato ONPG produz uma coloração amarela, indicando a sua presença. A presença da *E. coli* pode ser confirmada por fluorescência sob a luz UV, devido sua atuação sobre o substrato MUG.

11.4.2.6 Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

A pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* na água para uso farmacêutico pode ser realizada pelo método de filtração por membrana. Para todos os tipos de água para uso farmacêutico, *P. aeruginosa* deve estar ausente.

PROCEDIMENTO

Método de filtração por membrana

Filtrar 200 mL da amostra através de membrana de filtração estéril. Colocar cada membrana sobre a placa de ágar M-Pa-C de modo que não fique espaço entre a membrana e a superfície do ágar. Inverter as placas e incubar a $41,5 \pm 0,5$ °C por 72 horas. Tipicamente, as colônias de *P. aeruginosa* possuem de 0,8 a 2,2 mm de diâmetro e são aparentemente planas com borda clara e centro de acastanhado a verde escuro. Contar as colônias típicas, de preferência a partir do filtro contendo de 20 a 80 colônias. Confirmar a presença de *P. aeruginosa* por meio de testes bioquímicos adequados.