



**Ana Patrícia Freitas
Rei**

**O papel da microbiologia no desenvolvimento
farmacêutico**



**Ana Patrícia Freitas
Rei**

**O papel da microbiologia no desenvolvimento
farmacêutico**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Correia, Professor catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e Doutora Cláudia Silva, Diretora do Departamento de Investigação da Bluepharma[®], Indústria Farmacêutica, SA.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor catedrático do Departamento de Biologia da Universidade do Aveiro

Doutora Cláudia Silva
Diretora do Departamento de Investigação da Bluepharma[®], Indústria Farmacêutica, SA

Prof. Doutora Isabel Silva Henriques
Investigadora de pós-doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sérgio Simões, por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio na Bluepharma®, Indústria Farmacêutica, SA.

À Dr^a Cláudia Silva, minha orientadora, pela sua constante disponibilidade e pelos ensinamentos e conhecimentos que transmitiu.

Ao Prof. Dr. António Correia, meu co-orientador, por me ter disponibilizado o seu laboratório para realizar os ensaios de identificação pelo método de sequenciação do gene 16S e, por todo o apoio e grande disponibilidade prestados ao longo do estágio.

A todo o pessoal do laboratório de Microbiologia da Universidade de Aveiro, em especial, à Dr^a Isabel Henriques, pelo apoio e disponibilidade prestados na realização do método de identificação de isolados bacterianos pela sequenciação do gene 16S.

A todos colaboradores da empresa que me acompanharam, em especial, Ana Paula, Marta e D.Rosa, sem as quais o estágio não teria sido tão enriquecedor.

A todos os que contribuíram directa e indirectamente para o sucesso do Estágio e a elaboração deste trabalho, aqui fica o meu sincero agradecimento.

À minha mãe e familiares um muito obrigada por todo o apoio.

A todos os meus amigos, em especial, à Andreia Oliveira e ao Diogo Pinho pela amizade.

palavras-chave

Microbiologia, Indústria Farmacêutica, desenvolvimento, qualidade, regulamentação, validação, implementação.

resumo

A microbiologia tem uma grande diversidade de áreas de aplicação na indústria farmacêutica, estando presente nos vários setores. No presente trabalho foram desenvolvidas atividades em 2 grandes áreas: Controlo de qualidade de produtos não estéreis e de produtos estéreis e Investigação em cultura de células. Relativamente ao controlo de qualidade de produtos não estéreis foram validados métodos analíticos tradicionais para avaliação microbiológica de produtos e, no presente trabalho, apresenta-se a validação microbiológica de uma substância ativa: o oxalato de escitalopram. Foi realizada a validação de um sistema de produção de água purificada através do estudo da qualidade microbiológica da água produzida, recorrendo a métodos tradicionais e à sequenciação do gene 16S. Foi ainda efetuado o levantamento de todos os requisitos e guidelines relacionadas com a manipulação, enchimento assético e controlo de qualidade de um produto estéril destinado à administração parenteral em humanos, com o objetivo de fornecer toda a informação necessária para uma tomada de decisão por parte da Administração: realização de todos os procedimentos nas instalações da Bluepharma ou recorrer à prestação de serviço a terceiros. No que diz respeito às tarefas relativas à sala de cultura de células, para além da gestão da sala para seu correto funcionamento, foi parte integrante do presente estágio a implementação de um método de deteção de *Mycoplasma spp.* em culturas de células. Foi validado com sucesso o método analítico para o oxalato de escitalopram e foi possível colocar o equipamento de produção de água purificada a uso, na medida em que se demonstrou que este produz água com a qualidade pretendida e de forma consistente. Foi implementado com sucesso um método bioquímico de deteção de *mycoplasma spp.* para a sala de cultura de células, na forma de kit comercial, o MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit. Todas as atividades estabelecidas no plano de estágio foram concluídas e bem-sucedidas.

keywords

Microbiology, Pharmaceutical Industry, development, quality, guidelines, validation, implementation.

abstract

Microbiology has a wide variety of application in the pharmaceutical industry field and it is present in various sectors. In this work, the activities were developed in two broad areas: quality control of non-sterile and sterile products, and research in cell culture. The validation of analytical methods for microbiological evaluation of products was performed by traditional microbiological methods and the active substance escitalopram oxalate was taken as an example. The validation of the purified water system recently installed in Bluepharma was accomplished, using traditional methods and sequencing of 16S rRNA gene to study the microbiological quality of the produced water. All the requirements and guidelines relating to the handling, aseptic filling and quality control of a sterile product intended for parenteral administration in humans, were compiled in order to give support to a decision by the Administration from carrying out all tests on the premises of Bluepharma or resorting to outsourcing services. Regarding to the activities in the cell culture facility and in addition to the management of the facility, the implementation of a method for detecting *Mycoplasma spp.* in cell cultures was part of this work. The method for the escitalopram oxalate was validated successfully and purified water system was placed in use, since it produces consistently water with the desired quality. The information concerning the manipulation of sterile products was compiled in such way that, hereafter and with more data, the Bluepharma administration will be able to take an informed decision. A biochemical method for the detection of *Mycoplasma spp.* in cell cultures was successfully implemented in the form of a commercial kit: the MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit. All the activities established in the protocol were completed and successful.

ÍNDICE

Capítulo1. Introdução Geral	1
1.1. A indústria farmacêutica	1
1.2. Caracterização da entidade de acolhimento – A Bluepharma®.....	3
1.3. Descrição das atividades a exercer durante o período de estágio	4
1.4. Objetivos gerais.....	6
Capítulo2. A microbiologia na indústria farmacêutica.....	6
2.1. Legislação e guidelines	6
2.2. Fontes de contaminação	7
2.3. A microbiologia no controlo de qualidade de produtos farmacêuticos.....	8
2.3.1. Controlo de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos não estéreis.....	9
2.3.1.1. Validação de um método analítico para controlo microbiológico de uma substância ativa	9
2.3.1.2. Validação de um novo sistema de produção de água purificada	18
2.3.2. Controlo de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos estéreis.....	45
2.3.2.1. Manipulação e enchimento assético	46
2.3.2.2. Teste de esterilidade.....	49
2.3.2.3. Detecção de endotoxinas bacterianas	54
2.3.2.4. Conclusão.....	57
2.4. A microbiologia na cultura de células.....	58
2.4.1. O <i>Mycoplasma spp.</i>	58
2.4.2. Implementação de um método de detecção de <i>mycoplasma spp.</i> em culturas celulares na Bluepharma	60
Capítulo3. Conclusões e considerações finais	68
Referências bibliográficas.....	69
Anexos.....	i

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre o uso de fármacos e a esperança média de vida numa Europa envelhecida (2005-2010).....	1
Figura 2. Gastos com I&D na Europa, Estados Unidos e Japão de 1990 a 2007.....	1
Figura 3. Quota de mercado mundial dos medicamentos genéricos na Europa (1999-2009) [3].	2
Figura 4. Cadeia de valor da Bluepharma. Adaptado de um documento interno da empresa.	3
Figura 5. O processamento de uma amostra para a sua avaliação microbiológica.	10
Figura 6. Estrutura do oxalato de escitalopram.	10
Figura 7. Discos liofilizados e estirpe de <i>Candida albicans</i> revivificada.	13
Figura 8. Estirpe de <i>E.coli</i> em meio MacConkey agar.....	17
Figura 9. Esquema representativo dos vários tipos de água utilizados na indústria farmacêutica.....	19
Figura 10. Processo de formação de um biofilme.1-Fixação inicial; 2-Fixação irreversível; 3-Maturação primária; 4-Maturação secundária; 5-Dispersão.	21
Figura 11. Imagem representativa das regiões conservadas (a verde) e das regiões variáveis (a cinzento) do gene 16S	25
Figura 12. Imagem representativa do processamento de uma amostra de água purificada. 28	
Figura 13. Placas de R ₂ A após incubação durante 7 dias a 30-35°C.....	32
Figura 14. Unidades formadoras de colónias totais no sistema de produção de água purificada por dia, durante o período de testes de 14-11-2011 a 16-12-2011.....	33
Figura 15. Resultados da contaminação microbiológica do sistema de produção de água purificada em CFU por ponto de colheita.	34
Figura 16. Contaminação microbiológica de cada ponto de colheita das amostras de água purificada ao longo do período de testes.	35
Figura 17. Gel de agarose 0,8% em TBE 1x para as 7 amostras em estudo a par com o marcador de peso molecular (M).....	38
Figura 18. Gel de agarose 1,5% em TBE 1x mostrando as bandas do gene 16S com 1500 pb das 7 amostras amplificadas	39

Figura 19. Ensaio de validação do método de filtração para esterilização final de um produto estéril.	49
Figura 20. Metodologia disponível para o processo de validação do teste de esterilidade.	51
Figura 21. Interpretação dos resultados para o teste de esterilidade após os 14 dias de incubação.	52
Figura 22. Esquema representativo dos métodos existentes para a detecção de endotoxinas bacterianas.	55
Figura 23. Análise por FISH de células HeLa. DNA genómico de <i>Mycoplasma fermentans</i> a verde.	58
Figura 24. Esquema representativo do processo seguido para a selecção de um método para a detecção de <i>Mycoplasma spp.</i>	61
Figura 25. Imagem representativa do MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	63
Figura 26. Reação de bioluminescência que permite detetar o aumento de ATP gerado na presença de <i>Mycoplasma spp.</i> num ensaio com o kit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis, fungos e leveduras das 5 estirpes de microrganismos padrão testadas.	15
Tabela 2. Resultados da determinação do número total de fungos e leveduras para as 5 estirpes de microrganismos padrão testadas.	16
Tabela 3. Resultados da pesquisa de <i>E.coli</i> (estirpe ATCC 8739).	17
Tabela 4. Número total de microrganismos identificados durante a monitorização de um sistema de água purificada	24
Tabela 5. Descrição das 3 fases para a qualificação do desempenho do sistema de água purificada, duração e objetivos de cada uma.	26
Tabela 6. Período de testes de duas fases da qualificação de performance.	26
Tabela 7. Resultados da identificação de 3 isolados bacterianos pelo sistema API 20NE..	37
Tabela 8. Resultados da identificação de 5 isolados bacterianos pela sequenciação do gene 16S.	40
Tabela 9. Limites do número de partículas presentes no ar	47
Tabela 10. Limites de contaminação microbiológica para cada classe de sala limpa.	47
Tabela 11. Microrganismos padrão recomendados para o ensaio de validação do teste de esterilidade e controlo dos meio de cultura	50
Tabela 12. Metodologias existentes para realização do Teste de Lisado de Amebócitos de <i>Limulus</i>	56
Tabela 13. Espécies de <i>mycoplasma</i> mais comum em culturas celulares.	60
Tabela 14. Metodologias para deteção de micoplasma em culturas celulares e vantagens e desvantagens associadas.	62
Tabela 15. Resultados obtidos, na forma de razão, para o ensaio de linearidade do luminómetro testando as várias diluições do controlo positivo.	66
Tabela 16. Resultados obtidos, na forma de razão, para as amostras em estudo.	67

ACRÓNIMOS

API – Analytical Profile Index

ATCC - American Type Culture Collection (ATCC)

ATP - Adenosina trifosfato

AVAC - Aquecimento, ventilação e ar condicionado

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CSA - Soybean-Casein Digest Agar

DNA - Deoxyribonucleic acid

dNTP - Deoxiribonucleotídeo

EMA – European Medicine Agency

EMAS - Sistema de Eco-gestão e Auditoria da União Europeia

EPFIA - European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations

FDA – Food Drug Administration

GMP – Good Manufacturing Practice

HEPA - High-Efficiency Particulate Air

IDI – Investigação, Desenvolvimento e Inovação

IF – Indústria Farmacêutica

LAL – Limulus amoebocyte lysate

NAPP - Sodium Pyrophosphate

OMS – Organização Mundial de Saúde

OOS – Out of specification

pb – Pares de bases

PCR - Polymerase chain reaction

RNA – Ribonucleic acid

rRNA - Ribosomal RNA

SDA - Sabouraud dextrose agar

SP – Sampling point

SSRI - Selective serotonin reuptake inhibitor

SWOT – Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats

UV - Ultravioleta

WHO – World health organization

UFC – Unidades formadoras de colónias

USP – United states pharmacopoeia

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O aumento da esperança e qualidade de vida está, como representado na Figura 1, intimamente ligado aos progressos da ciência e, em particular, aos da indústria farmacêutica (IF). Em apenas um século, a esperança média de vida aumentou, a nível Europeu, 30 anos pela forte redução da mortalidade e desenvolvimento de novos medicamentos e/ou produtos biofarmacêuticos [1].



Figura 1. Relação entre o uso de fármacos e a esperança média de vida numa Europa envelhecida (2005-2010) [1].

Em 2010, o mercado global desta indústria valia mais de 850 mil milhões de dólares, enquanto que, em 2003, rondava os 500 mil milhões [2, 3].

A Indústria Farmacêutica destaca-se de outros sectores de atividade pelo seu elevado nível de investimento em I&D (Figura 2).

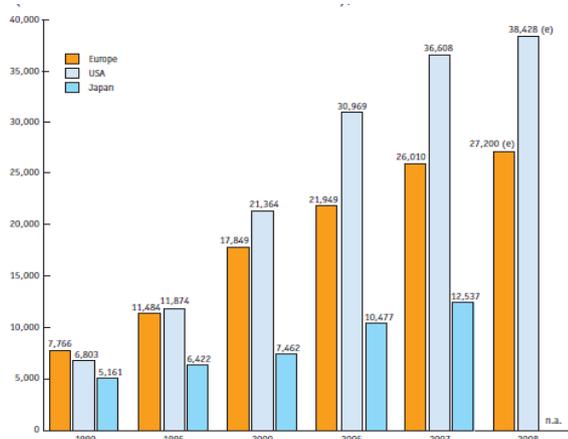


Figura 2. Gastos com I&D na Europa, Estados Unidos e Japão de 1990 a 2007 [4].

As estatísticas mais recentes apontam-na como o sector com maior investimento nesta área a nível mundial [4]. A nível europeu, cerca de 19% de toda a investigação feita no âmbito empresarial encontra-se relacionada com a área farmacêutica [4]. Importa referir que a atividade de I&D é morosa, dispendiosa, dependente de regulamentação rigorosa e acarreta elevados custos, assim como, investimento de risco, devido à possibilidade de insucesso no desenvolvimento de um medicamento. De destacar o crescimento da área dos bioprodutos de origem biotecnológica que apresentam taxas de crescimento superiores às do mercado global (17,9%) [5].

Como referido anteriormente, o tempo e investimento necessários para desenvolver um novo medicamento e os elevados custos com o sistema de saúde, em especial na faixa da população mais envelhecida, abriram caminho ao desenvolvimento de medicamentos genéricos (Figura 3) [2]. Apesar de estes estarem sujeitos às mesmas disposições legais dos medicamentos inovadores em termos de segurança e eficácia, (Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto) os medicamentos genéricos têm menores custos de desenvolvimento por estarem dispensados de realizar os ensaios pré-clínicos e clínicos já conduzidos pelas empresas que desenvolveram o medicamento inovador para aquela substância activa. Só têm de demonstrar a bioequivalência entre o medicamento inovador e o genérico em ensaios clínicos realizados em seres humanos e, é graças a este menor custo de desenvolvimento que estes medicamentos podem ser comercializados a um preço entre os 20-35% mais baixo que o respectivo inovador [6].

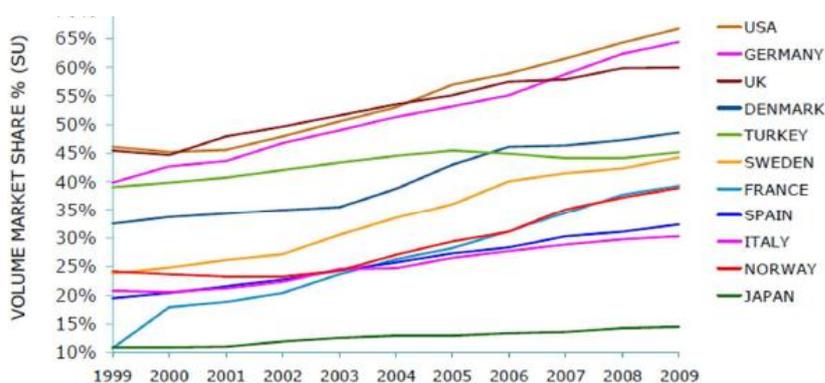


Figura 3. Quota de mercado mundial dos medicamentos genéricos na Europa (1999-2009) [3].

A evolução do mercado farmacêutico português é semelhante à do mercado mundial. O valor deste duplicou nos últimos dez anos, passando de 1.221 milhões de Euros

em 1996, para 2.415 milhões de Euros em 2010 o que corresponde apenas a cerca de 0,17% do valor do mercado farmacêutico mundial [7]. A quota de mercado dos medicamentos genéricos tem aumentado em Portugal, sendo que estes já representam cerca de 15% do mercado total, quando em 2000 apenas representavam uns residuais 0.1% [6]. Apesar do crescimento da quota de mercado dos medicamentos genéricos vendidos em Portugal esta ainda fica muito aquém do mercado mundial [6].

1.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENTIDADE DE ACOLHIMENTO – A BLUEPHARMA®

A Bluepharma® é uma empresa farmacêutica, de capitais portuguesas, com sede em Coimbra. Iniciou a sua atividade em Fevereiro de 2001, na sequência da aquisição, por um grupo de profissionais ligados ao sector, de uma das melhores e mais modernas unidades industriais do país, pertencente à multinacional alemã Bayer.

A sua atividade desenvolve-se, como descrito na Figura 4, em quatro áreas distintas:

- Produção de medicamentos próprios e para terceiros;
- Investigação & desenvolvimento;
- Licenciamento de tecnologias;
- Comercialização de medicamentos genéricos.



Figura 4. Cadeia de valor da Bluepharma. Adaptado de um documento interno da empresa.

A empresa dispõe de autorização de fabrico/importação de medicamentos e medicamentos experimentais nas seguintes formas: cápsulas duras, outras formas sólidas (pós e granulados), semi-sólidos, e comprimidos. Actualmente concentra a sua produção nas formas farmacêuticas sólidas, satisfazendo os requisitos associados às Boas Práticas de Fabrico (do inglês “Good Manufacturing Practices – GMPs”).

A Bluepharma foi a primeira empresa farmacêutica em Portugal a operar com a certificação integrada segundo as normas ISO 9001, ISO 14001 e OHSAS 18001, e a primeira do Setor da Indústria Farmacêutica a deter o Certificado ambiental EMAS, a mais exigente certificação ambiental europeia. Em 2009, foi inspecionada pela FDA (“Food and

Drug administration”), tornando-se assim na primeira empresa Portuguesa fabricante de formas farmacêuticas sólidas a obter esta certificação. Já este ano, a Bluepharma obteve a sua certificação em IDI – Investigação, Desenvolvimento e Inovação, segundo a NP 4457.

A Bluepharma conta, neste momento, com mais de 20 importantes clientes do mercado internacional (Merck, Sandoz, Stada, Ratiopharm, Biogaran, entre outros) e exporta para países dos 5 continentes. Em Portugal, tem vindo a desenvolver uma componente de comercialização de medicamentos genéricos contando, neste momento, com cerca de 50 medicamentos no mercado.

A empresa tem concentrado os seus esforços de Investigação em áreas emergentes, nomeadamente nanotecnologia, oncologia e biotecnologia, onde desenvolve um conjunto de projectos em parceria com outras empresas e centros de I&D nacionais e internacionais.

A empresa tem como missão *fornecer produtos farmacêuticos de qualidade excelente a preços competitivos, contribuindo, assim, para a prossecução dos objectivos de racionalização das despesas com a saúde e, simultaneamente, contribuir para a melhoria da qualidade de vida das populações. A Bluepharma assume integralmente os valores da qualidade, competência e inovação.*

1.3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES A EXERCER DURANTE O PERÍODO DE ESTÁGIO

O presente estágio envolveu actividades dos laboratórios de Microbiologia e Sala de Cultura Celular da Bluepharma e insidiu na aplicação da microbiologia em 2 grandes áreas da indústria farmacêutica:

- Controlo de qualidade de produtos não estéreis e de produtos estéreis;
- Investigação em cultura de células.

1.3.1. Controlo de qualidade de produtos não estéreis e de produtos estéreis

Para o controlo de qualidade de produtos não estéreis foram definidas actividades como a validação de métodos analíticos microbiológicos de novas substâncias activas/produto acabado. Esta tarefa consistiu na execução de todo o trabalho experimental e tratamento de dados com o objetivo desenvolver e validar um método laboratorial para avaliação microbiológica de uma substância/produto, de acordo com os métodos descritos nas especificações das farmacopeias. Depois de validado, o método permite a avaliação

microbiológica de rotina dos produtos em causa. Apesar da participação no processo de validação de vários produtos, apresenta-se, no presente trabalho, o exemplo do método de avaliação microbiológica para a substância ativa oxalato de escitalopram.

Na sequência da instalação na empresa de um novo sistema de água purificada foi necessário proceder à sua validação de forma a permitir a sua colocação a uso. Este processo de validação envolveu uma equipa multidisciplinar, constituída por colaboradores da Microbiologia e da Garantia da Qualidade. A nível microbiológico, a validação do sistema foi realizada pela análise da qualidade microbiológica da água produzida pelo novo sistema, assim como, pelo estudo da sua flora microbiana. Após a realização do trabalho laboratorial, foi efectuado o acompanhamento do tratamento de dados com o intuito de estabelecer uma periodicidade de análise e de sanitização, que permita a sua correta monitorização.

Foi também parte integrante do presente estágio, o levantamento de todos os requisitos e guidelines relacionadas com a manipulação e enchimento asséptico de um produto estéril destinado à administração parenteral em humanos, tanto a nível de infra-estruturas como de testes microbiológicos para o seu controlo de qualidade. Neste âmbito dois ensaios têm particular relevância: o teste de esterilidade e o teste de detecção de endotoxinas. O principal objetivo desta análise foi fornecer todas as informações necessárias para auxiliar a tomada de decisão por parte da Administração da realização destes testes nas instalações da Bluepharma ou, em alternativa, recorrer à prestação de serviços a terceiros.

1.3.2. Investigação em cultura de células

No que diz respeito às tarefas relativas à Sala de Cultura Celular, foi parte integrante deste estágio:

- a) a gestão da sala para seu correto funcionamento (ex: controlo dos stocks de reagentes e consumíveis, preparação do material biológico e não biológico para descontaminação/esterilização;
- b) Cultura Celular: preparação de meios e soluções para cultura de células; manutenção de linhas celulares em cultura;
- c) Implementação de um método de detecção de *Mycoplasma spp.* em culturas de células.

1.4. OBJETIVOS GERAIS

A microbiologia tem uma grande diversidade de áreas de aplicação na indústria farmacêutica, estando presente nos mais variados setores desde do controlo de qualidade à investigação, assegurando sempre qualidade e segurança dos produtos ou substâncias farmacêuticas.

No que diz respeito aos objetivos gerais do presente estágio, pretendeu-se que este permitisse uma visão mais realista do mercado de trabalho no domínio das ciências da vida e da biotecnologia e, na identificação de competências e capacidades necessárias para um bom desempenho profissional, o que por certo ajudará numa transição mais gradual da Universidade para o mercado laboral. Ambicionou-se, ainda, o ganho de maturidade, responsabilidade, autoconfiança e valorização pessoal.

O estágio teve como grande objetivo global, o desenvolvimento de diversos saberes a que o ensino universitário deve dar resposta: o saber-saber, saber-fazer e saber-ser, imprescindíveis para o alcance do sucesso profissional.

CAPÍTULO 2. A MICROBIOLOGIA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Os microrganismos estão ampla e ubiquamente distribuídos pelos diferentes habitats terrestres, como a água, o ar, os sedimentos e o solo. Uma das razões para esta ampla distribuição é a grande diversidade fisiológica em relação à utilização de compostos orgânicos e inorgânicos para sustentar a sua viabilidade, manutenção, reprodução e crescimento [8]. A indústria farmacêutica não é exceção e pode tornar-se num meio vulnerável e propício a contaminações microbianas se não for efectuado um controlo rigoroso.

2.1. LEGISLAÇÃO E GUIDELINES

Foi após a implementação das Boas Práticas de Fabrico pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no início dos anos 70, que grandes passos foram dados no controlo da contaminação microbiana na área farmacêutica [9]. Este documento reúne todas as práticas e sistemas necessários para a produção de medicamentos, controlo de qualidade e sistema de garantia da qualidade de fabrico. Os conceitos básicos destas orientações têm como principais objetivos a salvaguarda da saúde do paciente, bem como a produção de

medicamentos de boa qualidade. Estas diretrizes não são instruções sobre a forma de fabricar os produtos mas sim uma compilação de princípios gerais que devem ser tidos em conta durante esse processo [9].

Existem documentos oficiais que definem e estabelecem as normas e requisitos técnicos, de aplicação obrigatória, a que devem obedecer as matérias-primas, substâncias de uso farmacêutico, métodos analíticos e fármacos usados na Indústria Farmacêutica de forma a garantir a qualidade dos medicamentos (farmacopeias). Para além da farmacopeia portuguesa, as farmacopeias mais relevantes são a europeia [10], a japonesa [11] e a americana [12].

Em suma, todo o processo de fabrico, embalagem, armazenamento, assim como, de controlo de qualidade dos medicamentos, tem que estar de acordo com as boas práticas de fabrico de forma a garantir a qualidade e segurança do produto final.

2.2. FONTES DE CONTAMINAÇÃO

São várias as fontes de contaminação microbiana que podem afetar os medicamentos [13]. As de maior relevo são:

- **Matérias-primas:** São utilizadas na formulação dos produtos farmacêuticos e podem tornar-se substrato para o crescimento microbiano, uma vez que podem ser utilizadas pelos microrganismos como fonte de carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e sais orgânicos [5, 13].
- **Ar:** Os sistemas de ventilação das indústrias farmacêuticas são construídos de forma a minimizar a sobrevivência, distribuição e reprodução de microrganismos. Sabendo que muitos microrganismos são frequentemente associados a condutas de ar, o ar é filtrado através de um filtro 0.5 µm para evitar a entrada de qualquer partícula maior e minimizar a sua propagação por via aérea [14].
- **Pessoal de laboratório ou operadores:** Existem microrganismos característicos da flora normal da nossa pele e do corpo humano que fazem com que todos os colaboradores sejam a principal fonte de contaminação durante o processo de manipulação e fabrico de produtos farmacêuticos [14]. Para minimizar os riscos de contaminação, todos os colaboradores têm que respeitar e trabalhar segundo as boas práticas utilizando os equipamentos de proteção individual adequados às funções que desempenham [13].

- **Água:** Consiste na matéria-prima mais utilizada na indústria farmacêutica e é tratada quimicamente para reduzir o número de microrganismos patogênicos. É submetida a tratamentos que minimizam a carga microbiana, endotoxinas e, compostos orgânicos e inorgânicos [13, 14].
- **Equipamento e as áreas de fabrico:** Podem também ser consideradas uma fonte de contaminação pois existe sempre o risco de contaminação mesmo que a limpeza e sanitização de equipamentos seja efetuada de forma rigorosa e proporcione um ambiente hostil para que os microrganismos sobrevivam [13].

2.3. A MICROBIOLOGIA NO CONTROLO DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

A contaminação microbiana dos produtos farmacêuticos pode [15]:

- Alterar a sua estabilidade, tornando-os impróprios para consumo;
- Promover a degradação de componentes da formulação, podendo comprometer a sua eficácia;
- Causar danos à saúde, dependendo do tipo do microrganismo presente, da via de administração utilizada e do estado de saúde do consumidor;
- Acarretar elevados custos à empresa [15]

A identificação dos contaminantes microbianos em amostras de produtos e ambientais fornece informações importantes acerca das fontes de contaminação, sua distribuição e diversidade em ambientes farmacêuticos [13, 14]. Entre 1998 e 2006, a Food Drug Administration (FDA) analisou 134 produtos farmacêuticos não estéreis e 193 produtos estéreis associados a contaminação microbiológica [15]. Os resultados demonstraram que 60% das contaminações em produtos não-estéreis foram causadas por bactérias gram-negativas, enquanto apenas 4% estavam associadas a bactérias gram-positivas. Das amostras de produtos não-estéreis, 48% das contaminações tinham sido causadas por *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas spp.* ou *Ralstonia picketti* e 23% por leveduras e fungos. No que diz respeito aos produtos estéreis, os autores constataram que 6% das contaminações tinham sido causadas por bactérias gram-negativas e, apenas 1% devida a bactérias gram-positivas. Dos 193 produtos estéreis avaliados, 78% estavam contaminados devido a uma falha no processo de garantia da esterilidade e 7% pela

presença de leveduras. Em ambos os casos, a *B. cepacia* foi a espécie mais frequentemente isolada. Esta bactéria bem como a *Pseudomonas spp.* e a *Ralstonia picketti* estão frequentemente associadas a contaminações da água, enquanto que as bactérias gram-positivas, leveduras e fungos podem indicar um controlo ambiental ineficiente [15]. No outro estudo de Jimenez L. [13] é ainda referida a presença de populações microbianas em águas farmacêuticas e salas limpas que possam ser não cultiváveis.

Ao contrário dos produtos estéreis, para os quais se tem que garantir a esterilidade, as amostras de produtos farmacêuticos não estéreis podem conter alguns microrganismos dependendo da sua quantidade e patogenicidade. Estes limites encontram-se descritos em especificações das farmacopeias [13, 14].

2.3.1. CONTROLO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS NÃO ESTÉREIS

2.3.1.1. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA CONTROLO MICROBIOLÓGICO DE UMA SUBSTÂNCIA ATIVA

Após o desenvolvimento ou aquisição de uma nova substância ativa, é obrigatória a validação do método analítico para controlo da qualidade do mesmo [16]. Os ensaios de microbiologia destinam-se a determinar se uma substância (matéria-prima ou substância ativa) ou preparação farmacêutica (produto semi-acabado ou acabado) satisfazem uma especificação pré-estabelecida em matéria de qualidade microbiológica [16, 17]. De referir que estes métodos não são aplicáveis a produtos que contêm microrganismos viáveis como substância ativa propriamente dita [17]. O principal objetivo da validação de um método analítico de avaliação microbiológica para uma nova substância activa ou produto farmacêutico é demonstrar que este se adequa e tem capacidade para detetar possíveis microrganismos contaminantes. Para tal, é induzida propositadamente uma contaminação na amostra em estudo recorrendo a microrganismos padrão recomendados pelas farmacopeias [18]. Esta validação contempla dois ensaios: a determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis (incluindo fungos e leveduras) e a pesquisa de microrganismos específicos que se encontram descritos nas farmacopeias de acordo com as características físicas do produto. A adequação do método deve ser confirmada sempre que se faça uma alteração em qualquer procedimento ou alterações no produto que possam afetar o desempenho do método (ex: quando se altera algum excipiente do produto

farmacêutico) [17-19].



Figura 5. O processamento de uma amostra para a sua avaliação microbiológica.

As farmacopeias europeia e americana descrevem as metodologias que devem ser utilizadas e quais os métodos microbiológicos que podem ser utilizados em alternativa desde que seja demonstrada a sua equivalência com os recomendados como primeira opção [20]. Nos casos em que se

observa inibição do crescimento dos microrganismos padrão, para qualquer um dos ensaios pelos métodos ditos padrão, estão descritas estratégias que deverão ser seguidas, tais como: diluição da amostra numa solução tamponada; incorporação de agentes neutralizantes; filtração por membrana; ou ainda combinação de várias metodologias. Se nenhum dos métodos se mostrar apropriado o produto não é suscetível a contaminação microbiana pelos microrganismos testados. Ainda assim, não se pode descartar a possibilidade do produto ter capacidade para inibir o crescimento de outros microrganismos não testados [17, 19].

Após a validação dos métodos é elaborado um procedimento que descreve, pormenorizadamente, os passos do método que será utilizado nas análises de rotina do produto (Figura 5).

2.3.1.1.1. Caso de estudo: oxalato de escitalopram

O oxalato de escitalopram, cuja estrutura química está representada na Figura 6, constitui o princípio ativo do medicamento inovador Ciprallex[®], indicado para o tratamento da depressão major. Este princípio activo pertence ao grupo dos antidepressivos de terceira geração designados por inibidores seletivos da captação de serotonina (“selective serotonin reuptake inhibitor – SSRI”) [21].

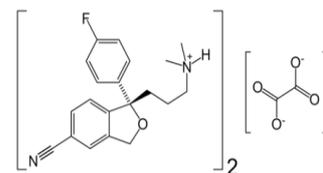


Figura 6. Estrutura do oxalato de escitalopram [21].

Está descrito na literatura que alguns destes antidepressivos de terceira geração apresentam uma atividade antimicrobiana significativa contra uma gama alargada de microrganismos [22].

Os mecanismos através dos quais os agentes psicotrópicos tais como o escitalopram atuam sobre os microrganismos ainda não estão totalmente definidos. O mecanismo mais estudado sugere que estes fármacos atuem como inibidores das bombas de efluxo, tal como

acontece nas células humanas [22]. Sabe-se que os microrganismos contêm uma diversidade de canais com proteínas envolvidas no transporte (afluxo ou efluxo) de uma grande variedade de nutrientes (açúcares, aminoácidos, sais, metais, etc) ou outros compostos (metabólitos nocivos, medicamentos, biocidas, detergentes, etc.). Entre estes transportadores destacam-se as bombas de efluxo que reconhecem agentes tóxicos e reduzem a sua acumulação intracelular [23]. São estas bombas que conferem aos microrganismos a resistência contra antibióticos, capacidade designada por “efflux-related multidrug resistance” (MDR) [24]. Assim, a inibição destas bombas de efluxo, recorrendo à ação de fármacos psicotrópicos, poderia vir a consistir numa estratégia promissora para restaurar a actividade de antibióticos já existentes.

Não existem, até à data, estudos que relacionem diretamente a capacidade antimicrobiana e o escitalopram mas, visto que, pertence a um grupo de agentes psicotrópicos supramencionados, pode sugerir-se que possa ter a mesma capacidade antimicrobiana.

Antes do processo de validação do método analítico microbiológico do oxalato de escitalopram foi importante reunir a informação disponível na literatura acerca da interação destes produtos com microrganismos. Não menos importante são informações acerca de validações analíticas microbiológicas, efectuadas anteriormente na empresa, para agentes psicotrópicos do mesmo grupo, tais como, sertralina, paroxetina e aripiprazole que nos podem fornecer algumas indicações acerca das metodologias que mais provavelmente serão adequadas.

Para produtos do tipo do oxalato de escitalopram a farmacopeia europeia obriga a que o controlo microbiológico deste contemple: a enumeração de microrganismos viáveis totais, incluindo fungos e leveduras, e a pesquisa da *E.coli* como micorganismo específico [25, 26].

2.3.1.1.2. Materiais e métodos

i. Amostra

O produto a analisar consistiu numa amostra do princípio ativo oxalato de escitalopram. A manipulação da amostra foi realizada sempre de forma a minimizar qualquer risco de contaminação externa e, todos os procedimentos utilizados estão de acordo com as recomendações dos capítulos 2.6.12/13 da farmacopeia europeia. Todos os

testes foram acompanhados por controlos positivos e negativos. A amostra de oxalato de escitalopram foi inicialmente dissolvida numa solução tamponada de cloreto de sódio pH 7,0 (NAPP) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

ii. Meios de cultura

Para a enumeração de microrganismos viáveis totais foram utilizados como meios de cultura, o agar de caseína e soja (CSA – Casein soybean agar) (Merck, Darmstadt, Alemanha) para a pesquisa de bactérias aeróbias e o agar de Sabouraud dextrose (SDA – Sabouraud dextrose agar) (Merck, Darmstadt, Alemanha) para a pesquisa de fungos e leveduras. O agar de caseína e soja é num meio não seletivo comumente utilizado para o crescimento de uma gama alargada de bactérias e contém caseína e farelo de soja que fornecem aos microrganismos aminoácidos e outras substâncias azotadas. O segundo meio de cultura utilizado, o SDA, é um meio sólido que contém peptonas, usado para cultivar dermatófitos e outros tipos de fungos e leveduras patogénicos e comensais [27].

Para a pesquisa de microrganismos específicos, neste caso da *E.coli*, foram utilizados os seguintes meios de cultura: caldo de caseína e soja, caldo de MacConkey (Oxoid LTD, Hampshire, Inglaterra) e o agar de MacConkey (Merck, Darmstadt, Alemanha). O caldo de caseína e soja difere do meio agar de caseína e soja acima referido por não conter agar, e funciona como meio de enriquecimento, estimulando o crescimento dos microrganismos. O caldo e o agar de MacConkey são meios diferenciais utilizados para detectar a presença de bactérias gram-negativas, fermentadoras de lactose, como é o exemplo da *E.coli*. As composições dos meios referidos estão descritas no Anexo I.

iii. Preparação das estirpes padrão

As estirpes de microrganismos padrão utilizadas foram as seguintes:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Escherichia Coli* ATCC 8739

As estirpes são fornecidas em forma de discos liofilizados (Selectrol® - TCS Biosciences Ltd, Buckingham, Inglaterra) que são posteriormente inoculados em placas

com meio de caseína e soja para as estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e, Sabouraud dextrose para as estirpes *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* (Figura 7).

Os microrganismos padrão foram utilizados, neste trabalho, para controlar os meios de cultura acima descritos e comprovar as suas propriedades nutritivas e, posteriormente, para contaminar proposadamente a amostra em estudo de oxalato de escitalopram.



Figura 7. Discos liofilizados e estirpe de *Candida albicans* revivificada.

iv. Determinação do número de microrganismos aeróbios viáveis totais, fungos e leveduras

Para a pesquisa de microrganismos aeróbios totais, a amostra de oxalato de escitalopram foi preparada como descrito no capítulo 2.6.12 da farmacopeia europeia, dissolvendo 10 g de amostra em 100 mL de NAPP para cada microrganismos em estudo e, posteriormente, inoculando neste volume uma suspensão do microrganismo padrão com um inóculo entre 10 a 100 UFC. Foi utilizada a técnica de sementeira em profundidade (representada na Figura 5) com 25 mL de meio CSA (para os microrganismos viáveis totais) ou SDA (para o fungo e levedura) liquefeitos e, testados 1 mL de duas concentrações diferentes da amostra (1:10 e 1:100). Para cada estirpe de microrganismo padrão utilizada, foi efectuado um controlo positivo que só difere do protocolo referido pela ausência de amostra e tem como objetivo avaliar a viabilidade dos microrganismos. Todos os ensaios foram efetuados em duplicado e as amostras incubadas em estufas Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) a 30-35°C durante 5 dias para as bactérias e 25-30°C durante 7 dias para o fungo e a levedura.

v. Pesquisa de microrganismos específicos – *E.coli*

Para a pesquisa de *E.coli*, a preparação da amostra foi também efectuada segundo o descrito no capítulo 2.6.12 da farmacopeia europeia, dissolvendo 10 g da amostra na solução de NAPP. Visto que, o objetivo desta etapa consiste na pesquisa de um organismo em específico, foram utilizados meios de enriquecimento e diferenciais, para estimular o crescimento e isolar, respetivamente, o microrganismo em estudo. Após a preparação, da amostra em NAPP foram testadas várias estratégias, descritas na farmacopeia europeia,

sempre em duplicado e as amostras incubadas numa estufa Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, reino Unido) a 30-35°C durante 5 dias.

- Estratégia 1: Constitui a abordagem usual para pesquisa de microrganismos específicos. Transferiram-se 10 mL do preparado da amostra em NAPP para o primeiro caldo de enriquecimento de Caseína e soja a par com um inóculo de *E.coli* com 10 a 100 UFC. De seguida, foi transferido um volume de 1 mL deste para 100 mL do caldo de MacConkey. No final, um volume de 100 µl foi inoculado no meio diferencial MacConkey agar.
- Estratégia 2: A segunda estratégia consistiu no aumento do volume de caldo de enriquecimento de Caseína e soja de 100 mL para 500 mL, mantendo os mesmos passos descritos acima para a estratégia 1. O objetivo consistiu em aumentar a disponibilidade de nutrientes para cada microrganismo.
- Estratégia 3: Processou-se a amostra dissolvida em NAPP pelo método de filtração, recorrendo a uma rampa de filtração (PALL Corporation, Port Washington, Estados Unidos) e uma membrana de tamanho de poro 0,45 µM (PALL Corporation, Port Washington, Estados Unidos). O objetivo consistiu em eliminar compostos que pudessem estar presentes na amostra e inibindo o crescimento do microrganismo. Depois da filtração foram seguidos os mesmos passos da estratégia 1.
- Estratégia 4: A última estratégia adotada, consistiu em aliar as estratégias 2 e 3, processando a amostra pelo método de filtração e aumentando o volume de caldo de enriquecimento de caseína e soja de 100 para 500 mL.

2.3.1.1.3. Resultados e Discussão

a. Determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis

Nas Tabelas 1 e 2 estão representados os resultados obtidos para a determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis totais, fungos e leveduras. Para cada ensaio, foi calculada a taxa de recuperação do microrganismo que se determina pelo rácio entre a média das unidades formadoras de colónias (UFC) por placa, na presença e na ausência (controlo) de amostra. Segundo as recomendações da farmacopeia europeia, para que o ensaio seja considerado válido, a taxa de recuperação do microorganismo tem que estar entre os 50 e 200%, ou seja, o número de UFC presentes nos ensaios teste tem que ser

no mínimo metade e no máximo o dobro do número das UFC presentes no controlo positivo correspondente [17].

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis, fungos e leveduras das 5 estirpes de microrganismos padrão testadas.

Determinação do número total de microrganismos aeróbios viáveis								
Estirpe padrão	Controlo		Amostra diluída 1:10			Amostra diluída 1:100		
	CFU/placa	CFU/placa	CFU/placa	CFU/placa	Taxa de recuperação Limite: 50% a 200%	CFU/placa	CFU/placa	Taxa de recuperação Limite: 50% a 200%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	33	39	24	30	75.0%	33	36	95.8%
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	29	30	19	23	71.2%	25	29	91.5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	36	40	21	16	48.7%	34	37	93.4%
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	27	31	12	20	55.2%	24	27	87.9%
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	21	24	0	0	0.0%	16	19	77.8%

Pode observar-se na Tabela 1 que os valores obtidos para os controlos positivos de cada microrganismo padrão foram os esperados, com valores muito próximos entre duplicados o que comprova a viabilidade dos microrganismos. Com a amostra diluída de 1:10 (0,1 g de substância activa), as taxas de recuperação rondaram os 70% para o *Staphylococcus aureus* e o *Bacillus subtilis*. No caso da *Candida albicans*, esta taxa rondou os 55% e no caso da *Pseudomonas aeruginosa* ficou ligeiramente abaixo do limite, nos 48,7%. Relativamente ao *Aspergillus brasiliensis* não se obteve qualquer crescimento na presença de produto, podendo descartar-se a possibilidade de inviabilidade do microrganismo pois o resultado para o controlo positivo correspondente encontrou-se dentro dos limites esperados. Assim, perante 0,1 g de oxalato de escitalopram, só o *Staphylococcus aureus*, o *Bacillus subtilis* e a *Candida albicans* apresentaram taxas de recuperação dentro dos limites. Analisando a Tabela 1 pode verificar-se que com a amostra diluída de 1:100 (0,01 g de amostra), todos os microrganismos alcançaram taxas de recuperação entre os 50 e os 200%.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados obtidos para a determinação do número total de fungos e leveduras. Obtiveram-se os valores esperados e muito próximos entre duplicados de controlos positivos, demonstrando a viabilidade do fungo e da levedura utilizados. Relativamente às taxas de recuperação, os resultados são semelhantes aos descritos anteriormente para estes microrganismos. Na presença de 0,1 g de amostra, as taxas de recuperação rondaram os 55% para a *Candida albicans* e 5,5% para o *Aspergillus brasiliensis* enquanto que no teste realizado com 0,01 g de amostra, rondaram os 84 e 76%, respectivamente. Assim, diluindo a amostra de oxalato de escitalopram e testando 0,01 g de amostra é possível detetar os microrganismos *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

Tabela 2. Resultados da determinação do número total de fungos e leveduras para as 5 estirpes de microrganismos padrão testadas.

Determinação do número total de fungos e leveduras								
Estirpe padrão	Controlo		Amostra diluída 1:10			Amostra diluída 1:100		
	CFU/placa		CFU/placa		Taxa de recuperação Limite: 50% a 200%	CFU/placa		Taxa de recuperação Limite: 50% a 200%
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	30	33	16	19	55.6%	24	29	84.1%
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	26	29	2	1	5.5%	19	23	76.4%

b. Pesquisa de microrganismos específicos – *E.coli*

A farmacopeia europeia prevê no capítulo 2.6.13 testes alternativos ou modificações à metodologia padrão/combinção de métodos que possibilitem o crescimento dos microrganismos padrão em presença da amostra. Na Tabela 3 estão representados os resultados para todas as 4 estratégias referidas anteriormente.

Este ensaio é, ao contrário da determinação de microrganismos aeróbios totais viáveis, um teste qualitativo, pois não é permitida a presença deste microorganismo nas matérias-primas ou produtos farmacêuticos. Por esse motivo, só existem 2 resultados possíveis: positivo ou negativo.

Tabela 3. Resultados da pesquisa de *E.coli* (estirpe ATCC 8739).

	Controlo negativo	Controlo positivo	Amostra
Estratégia 1	-	+	-
Estratégia 2	-	+	-
Estratégia 3	-	+	-
Estratégia 4	-	+	+

Pode verificar-se pela análise da Tabela 3 que somente no ensaio que combina a filtração da amostra em NAPP e o aumento do caldo de enriquecimento de caseína e soja de 100 mL para 500 mL (estratégia 4) se observou o crescimento de *E.coli* em meio MacConkey agar (Figura 8). Aparentemente a filtração do preparado de 10 g de amostra em NAPP terá permitido a eliminação de alguma substância presente na amostra que estivesse a inibir o crescimento microbiano. O aumento do volume de caldo de enriquecimento poderá ainda ter permitido mais disponibilidade de nutrientes para o crescimento do microrganismo. É importante notar que nenhum dos dois métodos isoladamente permitiu o crescimento da *E.coli*, ou seja, apenas com a combinação dos dois métodos se conseguiu eliminar o efeito inibitório.

Figura 8. Estirpe de *E.coli* em meio MacConkey agar.

Acima foi referida a capacidade antimicrobiana que alguns agentes psicotrópicos de terceira geração têm contra certos microrganismos, no entanto, acerca do oxalato de escitalopram ainda nada está descrito.

No que diz respeito aos microrganismos utilizados para a determinação de microrganismos viáveis totais, fungos e leveduras, a inibição do crescimento destes foi ultrapassado diminuindo a quantidade de amostra de 0,1 para 0,01 g. Ou seja, qualquer efeito antimicrobiano, caso presente, terá sido eliminado diluindo a amostra. No que diz respeito à pesquisa da *E.coli*, a inibição do crescimento microbiana foi mais difícil de contornar. Um efeito inibitório semelhante foi já referido na literatura para a sertralina que foi classificada pelos autores como inibidora das bombas de efluxo da *E.coli* [28]. Na medida em que o escitalopram e a sertralina pertencem ao mesmo grupo de agentes psicotrópicos poderá colocar-se a hipótese do efeito inibitório verificado em algumas concentrações de escitalopram poder ser também devido a um efeito da substância activa nas bombas de efluxo da *E. coli*.

2.3.1.1.4. Conclusão

Foi definido um método que permite a determinação dos microrganismos viáveis aeróbios totais, fungo e levedura, e um método para a pesquisa de *E.coli*. Ficou estabelecido que, o primeiro, será efectuado pela técnica de sementeira em profundidade perante uma quantidade de 0,01 g de amostra. Para a pesquisa de *E.coli*, a amostra de 10 g de oxalato de escitalopram verificou-se que esta terá que ser inicialmente filtrada por uma membrana de 0,45 µm e inoculada, consecutivamente, em dois meios de enriquecimento. A avaliação final da pesquisa do microrganismo específico (*E.coli*) será feita pela inoculação de um volume proveniente do segundo meio de enriquecimento em placa de Macconkey agar, visto ter sido o único método que permitiu o crescimento do microrganismo.

Pelos ensaios efectuados não é possível concluir acerca da capacidade antimicrobiana do oxalato de escitalopram, visto que, os dados recolhidos não são suficientes, nem todos os microrganismos foram testados nas mesmas condições e com esse objectivo. Neste trabalho a inibição do crescimento microbiano foi ultrapassada por pequenos ajustes ao método ditos padrão. Pelos estudos disponíveis para outros antidepressivos de terceira geração e, pela dificuldade em validar os métodos de controlo microbiológico, pode colocar-se em hipótese da capacidade do oxalato escitalopram para inibir o crescimento de microrganismos, no entanto, mais ensaios teriam de ser efetuados para demonstrar esta hipótese.

2.3.1.2. VALIDAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE ÁGUA PURIFICADA

2.3.1.2.1. Contextualização

A água pode ser considerada, na indústria farmacêutica, como uma das mais importantes matérias-primas, pois está diretamente envolvida na produção da maioria dos produtos e é ainda utilizada em processos de limpeza e esterilização a vapor [29, 30]. Existem diferentes tipos de qualidade da água:

- **Água purificada:** preparada a partir de água potável para produção de produtos farmacêuticos não estéreis;

- **Água para injetáveis:** preparada a partir de água potável, representando a água com qualidade mais elevada e utilizada para a produção de produtos farmacêuticos estéreis, como exemplo é o caso dos fármacos injetáveis;
- **Água ultrapura:** preparada a partir de água potável, só estando especificada na farmacopeia europeia e diferindo da água para injetáveis pelo método de tratamento utilizado [29].

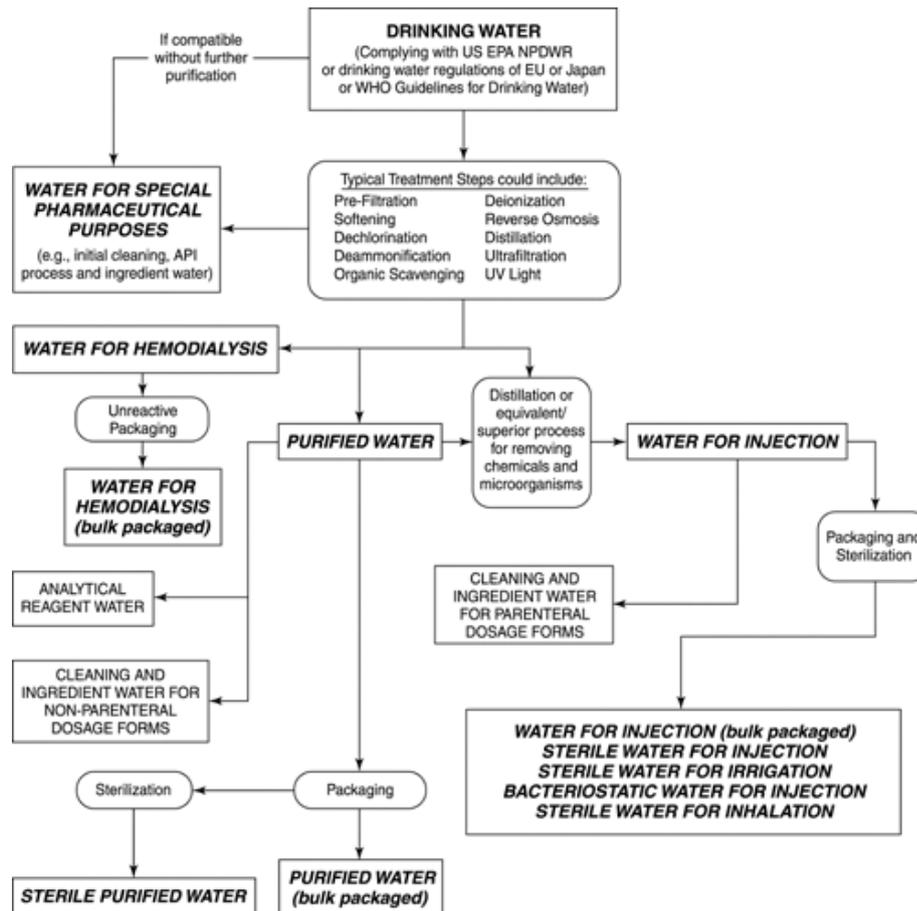


Figura 9. Esquema representativo dos vários tipos de água utilizados na indústria farmacêutica [30].

A qualidade da água depende de parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, nitratos, metais pesados e carbono orgânico total) e microbiológicos. Estes parâmetros sofrem variações dependendo do tipo de sistema de tratamento de água utilizado, frequência de manutenção e limpeza do mesmo, bem como dos procedimentos de armazenamento e distribuição da água produzida. Todos estes processos podem influenciar as características da água, comprometendo o seu uso final [31]. Assim, para garantir a qualidade da água produzida é necessário a seleção, instalação e operação adequadas do

sistema de produção bem como da validação dos processos de purificação, armazenamento e distribuição desta (Figura 9) [29-31].

A água para uso farmacêutico tem que ser purificada devido à presença de contaminantes inorgânicos e orgânicos na água potável resultantes da exposição ao meio ambiente [32]. Existem quatro principais tipos de contaminantes na água potável e cuja remoção é fundamental segundo [33]:

- a) Contaminantes particulados: substâncias orgânicas e inorgânicas insolúveis e suspensas na água;
- b) Contaminantes inorgânicos dissolvidos: iões como o cálcio, magnésio, ferro, cloretos, fosfatos, para além de metais pesados, gases e silicatos;
- c) Contaminantes orgânicos dissolvidos: com origem na natureza e são resultantes da degradação vegetativa, pesticidas, solventes, compostos orgânicos e resíduos de tecidos animais e vegetais;
- d) Contaminantes microbiológicos.

Relativamente à produção de água purificada, não existe nenhum método de purificação que assegure só por si a remoção de todos estes contaminantes. Os sistemas de produção de água purificada são constituídos por uma combinação de vários dispositivos de purificação que permitem obter a água com a qualidade pretendida [31, 34]. É importante ter em consideração que, as tubagens, filtros, tanques e outras superfícies que não fazem parte do sistema de purificação de água mas sim do sistema de abastecimento de água, podem ter condições favoráveis à adesão bacteriana e crescimento celular e também influenciam a qualidade da água. A nível microbiológico, existe sempre a possibilidade de formação de biofilmes (Figura 10) causados pela acumulação de microrganismos e que podem comprometer o uso da água produzida [35]. Caso seja utilizada uma água imprópria para o fabrico de produtos farmacêuticos, os microrganismos presentes ou seus metabolitos podem comprometer a qualidade do produto final. Independentemente do processo de tratamento utilizado, o desenvolvimento de biofilmes é difícil de evitar, podendo ocorrer com menor ou maior velocidade, consoante a qualidade da água potável, processo de tratamento utilizado e regime de operação do sistema [32].

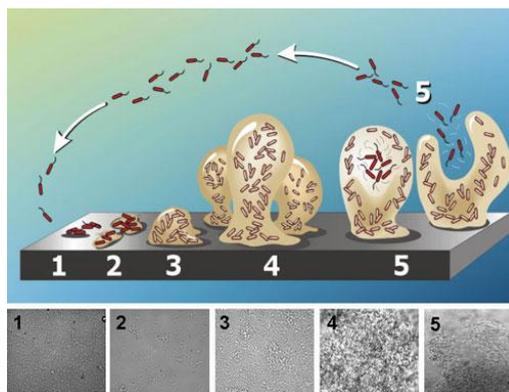


Figura 10. Processo de formação de um biofilme.1-Fixação inicial; 2-Fixação irreversível; 3-Maturação primária; 4-Maturação secundária; 5-Dispersão [31].

De forma a cumprir as Boas Práticas de Fabrico da IF é obrigatória a validação do sistema de produção de água purificada para uso farmacêutico e a monitorização microbiológica ao longo dos sistema de produção e abastecimento de água para assegurar em termos qualitativos e quantitativos a qualidade da água. [29, 36].

❖ O sistema de produção de água purificada

O sistema de água purificada instalado na Bluepharma (Figura 1 do Anexo II) é alimentado a partir de um tanque de água potável e produz cerca de 500 litros/hora de água. O pré-tratamento começa pela passagem da água potável por um filtro de areia e por uma coluna de carvão ativado que tem como objetivo retirar o material orgânico e eliminar o cloro.

Neste equipamento, a água pré-tratada é sujeita a várias etapas sucessivas de purificação antes de chegar a um tanque de armazenamento: filtração por um filtro de 10 μm , passagem por uma coluna com resina catiónica e, filtração por um filtro de 5 μm , a fim de evitar acumulação orgânica e oxidação do cloro na próxima etapa de purificação que corresponde a uma osmose reversa. Uma bomba de alta pressão alimenta uma membrana de osmose reversa através da qual são removidas substâncias orgânicas, iões, bactérias e pirogénios, diretamente para um dreno. O permeado passa depois por um módulo de electrodeionização (EDI) que remove as últimas impurezas iónicas e ocorre logo a seguir uma nova filtração através de um filtro de 0.2 μm . A seguir a esta última filtração ocorre uma esterilização por UV para controlo microbiológico [37].

A água purificada produzida é armazenada num tanque de aço inoxidável selado. A partir daqui a água é bombeada a uma velocidade superior a 1 m/s até aos pontos de recolha. Ainda é importante referir que a água é sempre mantida em circulação nos loops de distribuição e que existe um outro sistema de esterilização por UV depois das bombas de distribuição a par com um sistema de troca de calor com o intuito de manter a temperatura da água a rondar os 20°C [37].

Outro parâmetro fulcral para o bom funcionamento do sistema corresponde à sanitização. Esta pode ser efetuada de duas formas [30, 38]:

- a) aquecendo a água até aos 80°C no sistema de troca de calor;
- b) recorrendo a um sistema que injeta ozono no tanque de armazenamento, mantendo assim um intervalo pré-definido de concentração deste na água.

❖ **Processo de Validação do sistema**

O FDA descreve na sua Guideline “*On general principles of process validation*” que “*A Validação de um processo consiste em estabelecer provas documentadas que fornecem um elevado grau de segurança de que um determinado processo produzirá um produto de uma forma consistente, cumprindo as especificações e qualidade subjacentes*” [39]. Este processo consiste numa série de qualificações que envolvem ensaios, verificações de sistemas e, ainda, a análise de parâmetros críticos do processo [40]. Os diferentes tipos de qualificação englobados num processo de validação de um equipamento são: Qualificação do Design, Qualificação da Instalação, Qualificação de Operação e Qualificação de Desempenho [41-43].

O processo de validação do sistema de produção de água purificada da Bluepharma seguiu a mesma sequência que é utilizada para a validação de qualquer equipamento utilizado numa indústria farmacêutica. O processo é realizado em 3 etapas:

- **Qualificação da instalação:** Processo que garante e prova que o sistema foi instalado corretamente. Geralmente, envolve a criação de um protocolo e um plano de inspeção do sistema.
- **Qualificação operacional:** Engloba os testes que verificam se o equipamento, os alertas do sistema e os controlos funcionam de forma correta.

- **Qualificação da performance:** Em linhas gerais, consiste em retirar amostras durante um determinado período (conforme o tipo de água) e em pontos específicos do sistema para demonstrar que a qualidade da água está dentro dos parâmetros pré-definidos em todos os pontos de circulação. A nível microbiológico, é feita uma análise quantitativa pela enumeração de microrganismos viáveis presentes e, qualitativa pela identificação da flora microbiana presente [37, 42].

❖ **Identificação da flora microbiana do sistema**

A identificação das bactérias presentes no sistema de produção de água purificada reveste-se de particular interesse pois os microrganismos podem ser potencialmente prejudiciais, mesmo quando presentes em baixo número, tanto para os produtos como para os processos nos quais a água é usada. A análise qualitativa pode também ser muito útil para a identificação da fonte de contaminação microbiana ou até identificar a flora microbiana típica de um determinado sistema [36].

Utilizando metodologias de cultura microbiológicas tradicionais e sistemas de identificação baseados em testes bioquímicos foi possível identificar inúmeras bactérias presentes em amostras de água potável e purificada durante a monitorização de um sistema de produção de água purificada [35], ver Tabela 4. Foram identificados microrganismos do tipo bacilos gram-negativos não fermentadores dos géneros *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.* e *Acinetobacter spp.* que são considerados microrganismos oportunistas e muito comuns na natureza, tanto no solo, como na água, plantas (incluindo frutas e vegetais), animais e material orgânico em decomposição (por exemplo, em esgotos). São, também, frequentemente encontrados em sistemas de tratamento de águas, demonstrando a sua adaptação em ambientes com baixa concentração de nutrientes [35].

Tabela 4. Número total (e percentual) de microrganismos identificados durante a monitorização de um sistema de água purificada [34].

Microorganisms	strains	% of identification
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	32.05
<i>Pseudomonas picketti</i>	18	23.08
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	10	12.82
<i>Pseudomonas diminuta</i>	09	11.54
<i>Flavobacterium aureum</i>	05	6.42
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	04	5.13
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	02	2.56
<i>Pseudomonas putida</i>	02	2.56
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	01	1.28
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	01	1.28
<i>Flavobacterium multivorum</i>	01	1.28
Enumeration	78	100.0

A identificação rápida e precisa de isolados bacterianos é fundamental e, embora os métodos convencionais fenotípicos sejam relativamente baratos e permitam a identificação das bactérias mais frequentemente detectadas, certos grupos de bactérias são difíceis de identificar através destas metodologias. Os métodos convencionais fenotípicos são frágeis para bactérias raras ou com perfis ambíguos pois são dependentes do perfil bioquímico do microrganismo. Por esse motivo, os métodos moleculares têm particular interesse e aplicação neste contexto [33].

As técnicas moleculares (ex: PCR e Sequenciação) têm sido aplicadas tanto para amostras provenientes de ambientes naturais como para bactérias de difícil identificação [44]. Na década de 80, Woese e seus colaboradores, demonstraram que as relações filogenéticas entre bactérias poderiam ser determinadas pela comparação do código genético, a partir dos genes que codificam para as suas subunidades ribossomais: o 5S, 16S (também designado por subunidade pequena) e 23S [45]. Já na década de 90, Dubnau e o seu grupo de trabalho demonstraram a conservação na sequência do gene 16S rRNA de *Bacillus spp* e que esta advém da importância deste gene como componente indispensável à correta função celular [46].

O gene 16S rRNA, constituído por 1550 pares de bases, é altamente conservado mas possui várias zonas hipervariáveis (Figura 11) que permitem a identificação da maior parte das espécies [47] e é usada para a classificação taxonómica. Por este motivo o gene 16S é considerado um bom marcador molecular [44]. Por norma são utilizados primers universais, complementares às regiões conservadas no início do gene e a sequência da região variável é usada para a taxonomia comparativa [48].

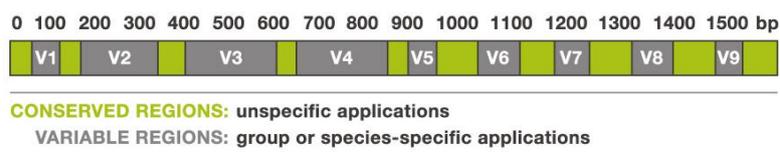


Figura 11. Imagem representativa das regiões conservadas (a verde) e das regiões variáveis (a cinzento) do gene 16S [44].

Na última década, com o uso generalizado da técnica de PCR e da sequenciação de DNA, o gene rRNA 16S começou a ter um papel fundamental na correta identificação de isolados bacterianos na medida em que esta análise pode ser aplicada a todas as bactérias. Hoje em dia, a análise é usada para a identificação e classificação de culturas puras e para estimar a diversidade bacteriana em amostras ambientais [49]. A técnica é particularmente importante para identificação de bactérias com perfis fenotípicos invulgares, raras, de crescimento lento e até não-cultiváveis, como são alguns microrganismos encontrados em amostras de água [47].

Após a sequenciação do gene 16S alvo, a identificação é feita com base na análise da homologia dessa sequência com sequências do gene do 16S depositadas em bases de dados. A identificação das espécies é reportada com base na correspondência mais próxima obtida a partir de ferramentas comparativas, tais como, BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Seqmatch (<http://rdp.cme.msu.edu>) [47].

Em 2006 foram analisados os biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água instalados em vários laboratórios clínicos, recorrendo aos métodos microbiológicos tradicionais e moleculares [33]. Graças à análise molecular, todas as bactérias encontradas foram identificadas com sucesso, mas somente 68% destas conseguiram ser cultivadas pelos métodos microbiológicos tradicionais. Recorrendo aos métodos tradicionais, os microrganismos mais frequentemente encontrados pertenciam à família *Pseudomonadaceae*. As espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, e *Acinetobacter baumannii* foram os microrganismos cultiváveis predominantemente encontrados na água após a sua passagem pelo sistema de purificação. Pelo método de sequenciação do gene rRNA 16S, 21 géneros bacterianos foram identificados[33]

Neste trabalho encontra-se descrita a avaliação microbiológica que foi efectuada para o novo sistema de água da Bluepharma. Os ensaios relativos aos parâmetros físico-químicos da água foram realizados por colaboradores do laboratório de controlo de qualidade da Bluepharma pelo que não se encontram aqui descritos.

2.3.1.2.2. Materiais e métodos

i. Estratégia de validação

Quando este estágio foi iniciado, tanto a qualificação da instalação como a qualificação operacional já tinham sido realizadas, ou seja, neste trabalho será descrita apenas a qualificação da performance. Para esta, adotou-se uma estratégia dividida em 3 fases que teve como objetivo demonstrar o grau de confiança e robustez do sistema, ao longo de um período de 12 meses (Tabela 5) [37, 42]

Tabela 5. Descrição das 3 fases para a qualificação do desempenho do sistema de água purificada, duração e objetivos de cada uma.

Fase	Duração	Objectivos
I	2 semanas de monitorização intensiva, com o sistema a operar continuamente.	Demonstrar a produção com a qualidade e quantidades pretendidas; Definir gamas de operação; Consolidar procedimentos de sanitização e manutenção do sistema.
II	2 semanas de monitorização intensiva depois de obtidos resultados satisfatórios na fase 1.	Demonstrar uma produção e distribuição consistentes ao longo do tempo de operação, sempre garantindo a qualidade.
III	1 ano após obtenção de resultados satisfatórios na fase 2.	Demonstrar desempenho consistente ao longo de um período de tempo alargado.

Durante o período do presente estágio foi possível completar as fases I e II. As duas primeiras fases de testes tiveram como objetivo demonstrar a produção e fornecimento de água com a qualidade exigida, confirmar a adequação dos parâmetros para os processos críticos e assegurar a viabilidade dos procedimentos de controlo em curso, tais como frequência e higienização. O teste de qualificação foi realizado, como descrito na Tabela 6, todos os dias úteis entre os dias 14 de novembro e 16 de dezembro, abrangendo um total de 32 dias seguidos ou 21 dias úteis.

Tabela 6. Período de testes de duas fases da qualificação de performance.

Fase de qualificação	Data
Fase I	14.11.2011 até 25.11.2011
Fase II	28.11.2011 até 16.12.2011

ii. Caracterização do local

Foram retiradas amostras de água de 30 pontos segundo o diagrama do sistema de produção de água purificada representado na Figura 1 do Anexo II. As amostras foram colhidas a partir de pontos de abastecimento (laboratórios e produção) e da zona técnica (onde está localizado o sistema) (SP – sampling point) (Figura 1 do Anexo II). Os pontos considerados mais críticos: o SP2, correspondente à entrada no tanque de armazenamento a partir do sistema de água purificada, o SP4 após a coluna de esterilização UV no circuito de distribuição, o SP6 e o SP7 no retorno das alças de fornecimento, foram testados diariamente durante as duas fases de testes. Os restantes locais de amostragem foram testados de forma rotativa.

iii. Colheita da Amostra

A colheita das amostras é sempre um passo crítico visto que, se as condições desta não forem cumpridas, os resultados obtidos podem não ser válidos, fazendo com que a colheita tenha que ser repetida [42]. Os principais passos e cuidados para a colheita de água purificada foram:

- a) Deixar correr a água no ponto de colheita durante 2 minutos a um caudal constante;
- b) Colher a amostra de água para um “erlenmeyer” estéril de 500 mL, autoclavado no autoclave da microbiologia (Matachana Group, Barcelona, Espanha), tendo o cuidado de o manusear corretamente de forma a evitar contaminação externa.

As amostras para a microbiologia tem que ser analisadas imediatamente após a colheita ou então armazenadas a 4 °C para preservação da sua integridade [35, 42]

É importante referir que, a nível microbiológico, não existe repetibilidade de amostras pois a água não é sempre a mesma e tem um máximo de 24 horas de estabilidade.

iv. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para pesquisa de microrganismos totais foi o R₂A agar (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a sua composição está descrita no Anexo I. Este meio de cultura contém um baixo teor de nutrientes que, em combinação com uma baixa temperatura de incubação e um tempo de incubação prolongado, se torna ideal para o crescimento de bactérias características da água potável.

Antes de ser utilizado para processar as amostras de água, o meio de cultura R₂A foi controlado, recorrendo às 7 estirpes de microrganismos padrão, a fim de assegurar a sua esterilidade e qualidade nutritiva.

v. Processamento da amostra

Como representado na Figura 12, 1 mL de cada amostra de água foi filtrada numa câmara de fluxo laminar horizontal Sah 100 (Telstar, Life Sciences, Nova Iorque, Estados Unidos), através de uma membrana de 0,45 µm (PALL, Port Washington, Estados Unidos). Esta membrana foi posteriormente incubada no meio R₂A a 30-35°C durante 5-7 dias. Cada ponto foi analisado em duplicado e comparam-se sempre os resultados com um controlo negativo que consistiu numa amostra de água purificada previamente esterilizada. As colónias de microrganismos em cada placa foram enumeradas e reportadas como unidades formadoras de colónias (UFC) por mililitro de amostra.

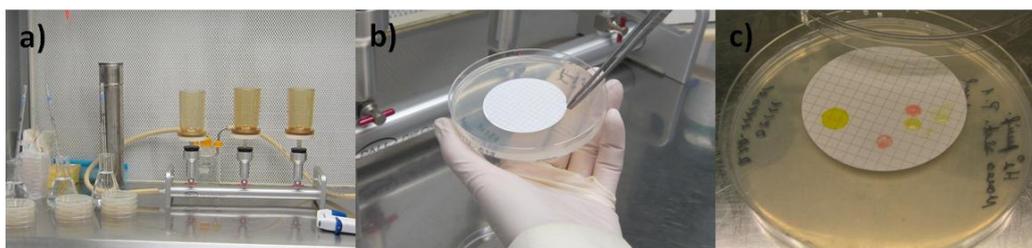


Figura 12. Imagem representativa do processamento de uma amostra de água purificada. a) Filtração das amostras de água; b) Inoculação da membrana em meio R₂A agar; c) Placa de R₂A após 7 dias de incubação a 30-35°C.

vi. Isolamento e identificação dos microrganismos

As colónias morfológicamente diferentes foram repicadas das membranas para um meio novo de R₂A agar e incubadas novamente a 30-35°C durante 5 a 7 dias. Depois do período de incubação foi realizada uma análise macroscópica e uma avaliação morfológica das colónias.

a) Identificação dos microrganismos por testes bioquímicos

A identificação dos microrganismos isolados foi realizada, numa primeira abordagem, por métodos bioquímicos recorrendo aos sistemas de identificação API (“Analytical profile index”) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). Foram realizados vários testes preliminares, cujo resultado indica a galeria API mais adequada para a deteção de cada isolado bacteriano (Figura 2 do Anexo II). O primeiro passo consistiu na realização

de uma coloração de Gram de cada isolado recorrendo ao Kit Color Gram 2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) que permitiu distinguir entre bactérias gram positivas e gram negativas. Com o mesmo objectivo, foi realizado o ensaio da L-Alanina-Aminopectidase, recorrendo às tiras Bactident[®] Aminopectidase (Merck, Darmstadt, Alemanha). De seguida, foram realizados o teste da oxidase, que permite diferenciar bacilos gram negativos tipo enterobactérias ou não enterobactérias utilizando as tiras Bactident[®] Oxydase (Merck, Darmstadt, Alemanha), e o teste da catalase que permite diferenciar estafilococcus de estreptococcus, usando peróxido de hidrogénio.

Através do esquema da Figura 2 do Anexo II, e pelos resultados obtidos nestes testes preliminares foi possível escolher o sistema de identificação mais adequado. Neste caso, foram utilizados dois sistemas diferentes: (i) API 20 NE kit (Biomérieux, França) que foi utilizado para a identificação de bacilos gram-negativos não-fastidiosos não pertencentes à família Enterobacteriaceae; (ii) API 20 E kit (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) que foi utilizado para a identificação de bacilos gram-negativos não-fastidiosos pertencentes à família Enterobacteriaceae e outros bacilos gram negativos não-fastidiosos. As reacções foram visualizadas pela adição de agentes reativos, API 20E e API 20 NE reagents (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França).

b) Identificação molecular de microrganismos

Esta identificação foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Aveiro.

1. Extração de DNA total

O primeiro passo para a extração do DNA de cada isolado bacteriano consistiu em ressuspender uma boa quantidade de colónias de cada tipo num volume de 200 µL de tampão de extração (TE). Visto que as bactérias são provenientes de amostras de água e lisam dificilmente induziu-se a lise bacteriana previamente recorrendo a uma solução de Lisozima 20 mg/mL. A extração do DNA total das amostras foi realizada recorrendo ao kit Genomic DNA purification kit (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

2. Integridade do DNA extraído

A integridade do DNA genómico extraído foi verificada visualmente após a realização de uma electroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TAE 1x. As amostras a analisar foram preparadas adicionando 1 µl de tampão de carga a cada 5 µl de DNA. Para visualizar as bandas obtidas recorreu-se a 1 µl do marcador de peso molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp (Fermentas, Life Sciences, Estados Unidos). A electroforese foi efectuada a 80 volts durante 80 minutos. Os géis foram corados com 1 µg/ml de brometo de etídio em tampão TAE 1x e as bandas visualizadas num transiluminador Molecular Imager FX system (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos).

3. Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação dos segmentos de DNA que codificam para o rRNA 16S foi realizada utilizando os primers 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG e 1942R 5'-TACCTTGTTACGACTT. As reacções de PCR foram realizadas num volume total de 25 µl, contendo para cada reacção: 2,5 µl de cada primer, 1 µl de DNA molde (concentração não determinada), 2 nM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e água estéril até prefazer o volume final de 25 µl. As reacções de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos (min), seguida de 30 ciclos de amplificação de 1 min a 94°C para desnaturação seguido de 1 min a 55°C para a hibridação dos primers, e 2 min a 72°C para a extensão. No final efectuou-se um passo de extensão durante 10 min a 72°C.

4. Confirmação dos produtos da PCR

A confirmação da dimensão e integridade dos produtos resultantes das reacções de PCR foi realizada após separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE 1x. As amostras foram preparadas como descrito no ponto 2 e as visualização das bandas foi efectuada recorrendo a um transiluminador Molecular Imager FX system (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos).

5. Purificação dos produtos da PCR

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados para retirar o excesso de dNTPs, primers e restantes reagentes. Para tal, recorreu-se ao kit JetQuick Spin Column

Technique (Genomed, Löhne, Alemanha) no qual o DNA é selectivamente ligado à membrana altamente especifica de sílica durante a centrifugação.

6. Sequenciação

Após o passo de purificação, as amostras foram enviadas para uma empresa especializada para serem sequenciadas. Após a recepção dos resultados, as sequências foram editadas manualmente no programa FinchTV e analisadas na base de dados GeneBank para avaliar a similaridade com sequências de microrganismos depositadas nessas bases de dados.

2.3.1.2.3. Resultados e Discussão

Como referido anteriormente, o grande objectivo desta validação de desempenho do novo sistema de produção de água purificada foi demonstrar que a produção e distribuição de água purificada da Bluepharma através do novo sistema é capaz de produzir água com a qualidade necessária e de forma consistente ao longo do tempo de operação. No sistema de produção de água purificada instalado na Bluepharma, é utilizada uma variedade de tratamentos (por exemplo, filtração, luz UV e calor) a fim de remover, destruir, e controlar a presença de microrganismos. Apesar destas precauções, tubos, filtros, tanques e outras superfícies dentro do sistema fornecem condições favoráveis para a adesão bacteriana e crescimento celular. Assim, a monitorização microbiológica de pontos seleccionados ao longo do sistema é essencial. Nos pontos seleccionados é necessário determinar o número e tipos de microrganismos detetados a fim de poder avaliar o seu impacto [36].

a) Avaliação quantitativa da água purificada

Para a análise dos resultados dos ensaios microbiológicos obtidos é importante definir três conceitos: nível de alerta, nível de acção e limite máximo. Um nível de alerta ocorre quando existem 30 ou mais unidades formadoras de colónias por mililitro de amostra de água, o que indica que poderá ter havido um desvio nas condições de operação do sistema. São considerados como alertas pontuais e que não requerem, por esse motivo, uma acção corretiva obrigatória [30]. O segundo conceito (nível de acção) é despoletado

quando é detetado um nível de alerta em 3 análises consecutivas ou, quando existem 70 ou mais unidades formadoras de colónias por mililitro de amostra recolhida. Este valor indica que está a ocorrer um desvio anormal do sistema e é necessário elaborar um relatório de não-conformidade e abrir uma investigação com o intuito de apurar as causas do desvio de forma a evitar uma recorrência [30].

Tanto a farmacopeia europeia como a americana têm definido nas suas especificações os limites máximos para todos os parâmetros que têm que ser analisados na avaliação da qualidade da água purificada (Tabela 1 do Anexo II). O limite associado ao número total de microrganismos num determinado ponto é de 100 UFC/mL. Se tal acontecer é necessário realizar uma investigação que dá origem a um relatório de não conformidade (“Out of specification report”) onde se descreve o resultado da investigação que tem como objectivo identificar as possíveis causas desse desvio. Se o sistema estiver a uso, o ponto de colheita em questão fica desativado até que a investigação termine ou seja eliminada a contaminação. Após identificação da(s) possível (is) causas devem ser tomadas uma ou mais ações corretivas, por exemplo, recorrendo a nova desinfecção [30].

Na Figura 13 encontram-se dois exemplos de contaminação microbiana em duas placas de petri de R₂A após processamento de uma amostra de água purificada após 7 dias de incubação a 30-35°C.

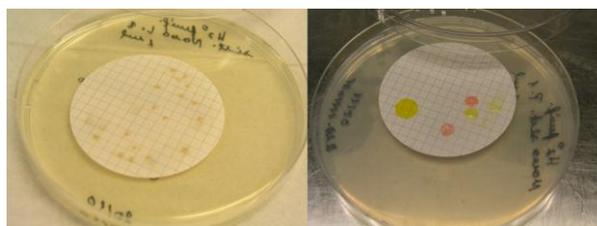


Figura 13. Placas de R₂A após incubação durante 7 dias a 30-35°C.

A partir das placas de R₂A foram enumeradas as colónias presentes à superfície da membrana e reportadas por mililitro de amostra recolhida. Os resultados para todos os pontos durante todo o período de testes encontram-se compilados na Tabela 2 do Anexo II. A partir desses resultados foi possível elaborar, como se pode observar pela Figura 14, o gráfico de caixas de bigodes, para a enumeração em unidades formadoras de colónias totais por mililitro de amostra no sistema por dia. A partir deste gráfico observa-se que o sistema se mostra consistente ao longo do período de testes pois o comportamento a nível microbiológico é semelhante ao longo dos dias e não apresenta grande variabilidade.

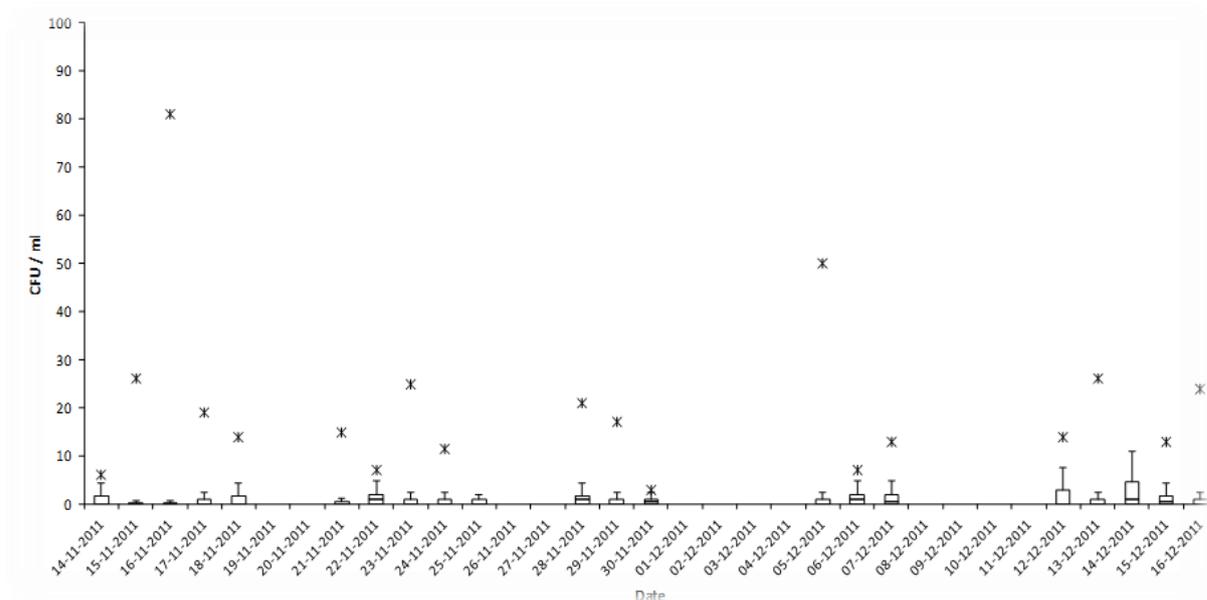


Figura 14. Unidades formadoras de colónias (UFC) totais no sistema de produção de água purificada por dia, durante o período de testes de 14-11-2011 a 16-12-2011.

Na maioria dos dias existe um “outlier”, ou seja, um valor fora de tendência mas que nunca ultrapassa o limite máximo de microrganismos viáveis aceite nas farmacopeias europeia e americana.

No gráfico da Figura 15 encontra-se a relação entre o número total de microrganismos viáveis por ponto ao longo de todo o período de testes. Analisando o gráfico verifica-se que o comportamento do sistema é consistente até ao ponto L6. Esta uniformidade de dados contempla os pontos da zona técnica e de produção e alguns pontos dos laboratórios e não existem variações significativas entre si.

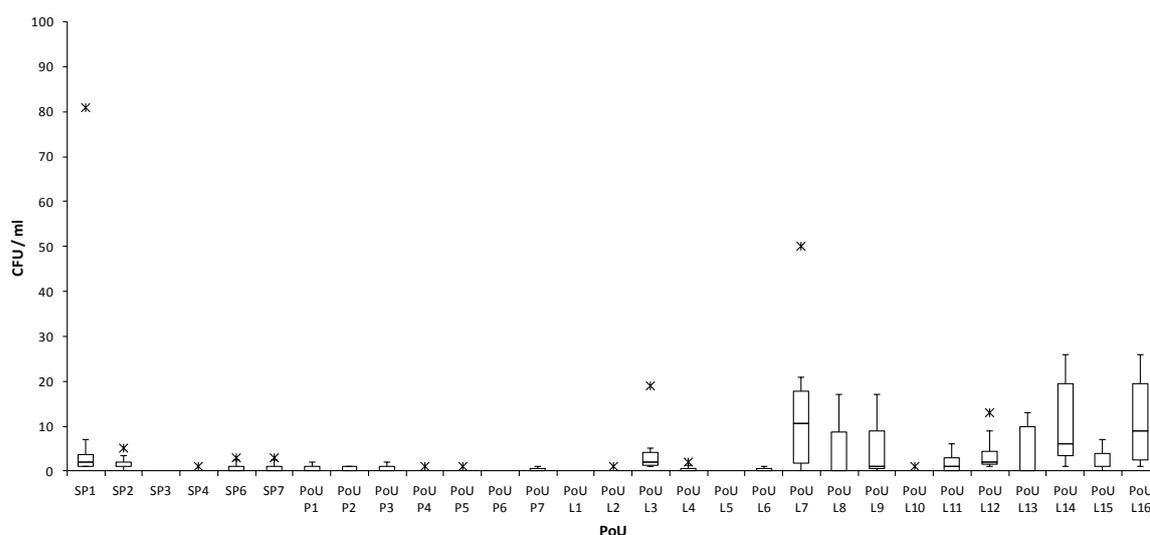


Figura 15. Resultados da contaminação microbiológica do sistema de produção de água purificada em CFU por ponto de colheita. SP – Zona Técnica; PoU P – ponto de colheita na produção; PoU – ponto de uso no laboratório.

É de notar nos dois gráficos anteriores, a existência de um “outlier” no ponto de colheita SP1 detectado no dia 16-11-2011 que apesar de elevado (81 UFC/mL) e continuar dentro da especificação, corresponde ao que anteriormente foi definido como nível de ação. Como pode ser observado pelo esquema do sistema de produção de água purificada representado (Figura 1, Anexo II), o ponto de colheita SP1 está localizado imediatamente após a electro-desionização e antes da coluna de esterilização por UV do sistema. Neste caso, não foram necessárias ações corretivas, visto que:

- a) Devido ao período de sete dias de incubação, quando o valor anormal foi detectado, já outras amostras deste ponto tinham sido colhidas sem quaisquer sinais de contaminação após 7 dias de incubação;
- b) Este ponto não é considerado um ponto crítico segundo as normas das Boas práticas de fabrico;
- c) O número de microrganismos viáveis detetados no ponto a jusante, o SP2, localizado entre a coluna de UV e o tanque de armazenamento, foi de apenas 1 UFC/mL, comprovando a funcionalidade do UV.
- d) Os resultados obtidos para o mesmo ponto nos dias seguintes são aceitáveis, tendo-se obtido um máximo de 4 UFC/mL isoladas.

Desta forma pode concluir-se que a contaminação não se propagou a jusante do SP1 e que a contaminação neste ponto foi um acontecimento isolado. Poderá colocar-se a

hipótese desta contaminação tenha sido devida a uma falha no procedimento de colheita da amostra.

Relativamente aos pontos de utilização L7, L8, L9, L13, L14 e L16, estes apresentaram uma maior dispersão de valores do que os pontos referidos anteriormente. Pela Figura 16 é possível verificar que não há uma tendência discernível nos resultados para os pontos de utilização acima mencionados durante o período de testes.

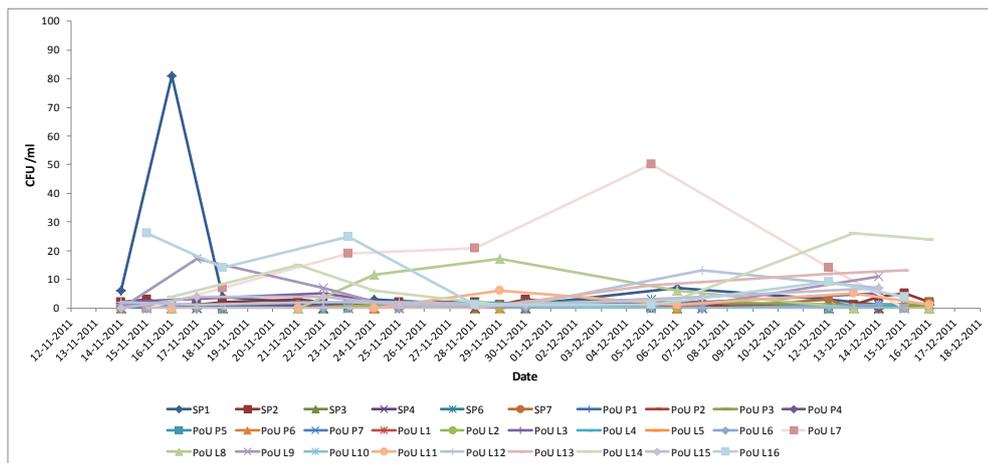


Figura 16. Contaminação microbológica de cada ponto de colheita das amostras de água purificada ao longo do período de testes.

Apesar da grande variabilidade verificada, todos os valores registados para os pontos L7 a L16 estão abaixo do limite definido como nível de acção (70 CFU/mL) e, à excepção do valor observado no ponto L7 de 50 UFC/mL, todos os outros pontos apresentaram valores inferiores ao nível de alerta (30 CFU / mL).

Ao longo das primeiras duas semanas de testes o ponto de colheita L16 demonstrou alguma variabilidade, tendo-se detetado valores anormalmente elevados que variaram entre as 14 e as 26 CFU/mL. Juntamente com o facto dos outros pontos do sistema, nomeadamente o ponto de colheita SP7, não terem demonstrado quaisquer sinais de anormalidade, pode supor-se que a contaminação seja originária de um tubo que não estivesse exposto ao ozono durante a desinfecção. O ozono é injectado no tanque de armazenamento da água e recircula durante pelo menos 30 minutos a 50 ppm. Durante esta higienização, todas os pontos e válvulas de fornecimento devem permanecer fechados por razões de segurança e de forma a evitar a perda de ozono, o que faz com que os tubos de descarga não sejam expostos ao desinfectante.

Assim, a análise microbiológica da água mostra que os procedimentos de controlo são adequados. O teste de qualificação terminou a 16 de dezembro, 35 dias após a sanitização térmica e todos os resultados estavam dentro do limite da especificação, o que atesta que os procedimentos de controlo adotados para o sistema de armazenamento e distribuição, o fluxo de água turbulenta, a temperatura da água, a esterilização por UV, a desinfecção por ozono e os procedimentos de higienização térmicas são os adequados para garantir a robustez do fornecimento de água com qualidade microbiológica.

É, no entanto, importante referir que os resultados obtidos neste estudo poderão estar abaixo dos valores de contaminação reais. Kawai e seus colaboradores analisaram pela técnica de electroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) a comunidade bacteriana presente na água purificada usada em processos de fabrico de produtos farmacêuticos. Os autores verificaram que a bactéria dominante nessa água purificada não pôde ser detectada pelos métodos convencionais, como o cultivo em meio R₂A e, ressalvam a importância do uso de métodos independentes de cultura como são as técnicas moleculares [36]. Tal facto poderia comprometer o presente estudo, no entanto, visto que o método recomendado nas farmacopeias consiste no método de cultura, aceitam-se os valores obtidos como fidedignos.

b) Avaliação qualitativa da água

1. Isolamento de microrganismos

Durante o período de testes foram isoladas, a partir das placas de R₂A iniciais e de 7 pontos de colheita distintos, 10 colónias morfológicamente diferentes. A designação de cada isolado corresponde ao ponto de colheita de onde é proveniente, sendo que, dois isolados do mesmo ponto se diferenciam pelas letras a) e b).

Depois de isoladas, as colónias foram estudadas a nível morfológico e os resultados estão descritos na Tabela 3 do Anexo II.

2. Identificação de microrganismos pelo método bioquímico

Os resultados dos testes preliminares encontram-se compilados na Tabela 4 do Anexo II. Pode observar-se que em muitos casos o resultado da coloração de Gram não está concordante com o resultado do LAAP, pois para os isolados dos pontos S1a), P1a),

P1b) e L12, a coloração indica que o microrganismo é Gram negativo enquanto que o teste LAAP indica que estes são Gram positivo. Nestes casos o resultado do LAAP foi descartado por este teste ser menos fidedigno e apresentar, frequentemente, resultados falsos negativos. Como descrito na Tabela 7, só foi possível identificar através do sistema de identificação API 20NE, 3 dos 10 isolados bacterianos.

Tabela 7. Resultados da identificação de 3 isolados bacterianos pelo sistema API 20NE.

Ponto de colheita	Identificação	% Identificação	Classificação
L8 a)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	92,7	Boa identificação
L8 b)	<i>Ralstonia picketti</i>	99,1	Muito boa identificação
L 14	<i>Bulkholderia cepacia</i>	99,9	Excelente identificação

Este baixo número de isolados identificados por estes sistemas de identificação não é surpreendente, pois, apesar do método ser de fácil elaboração e os resultados serem obtidos num curto período de tempo, esta metodologia não permite identificar espécies que não estejam incluídas no sistema de base de dados, que se encontra direccionado particularmente para amostras clínicas. Ainda assim os 3 isolados identificados resultaram numa classificação considerada, pelas indicações do fabricante, fidedigna com percentagens de identificação acima dos 90%.

Os isolados em estudo, provenientes de amostras de água, são caracterizados por serem adaptativos e poderem facilmente sofrer pequenas variações a nível bioquímico, factor que dificulta a sua identificação usando exclusivamente esta metodologia. Por este motivo, as restantes 7 espécies bacterianas isoladas foram identificadas pelo método de sequenciação do gene 16S.

3. Identificação de microrganismos pelo método de 16S rRNA

A primeira etapa deste procedimento consistiu na extracção do DNA genómico dos 7 isolados bacterianos e verificação da integridade do DNA extraído por electroforese em gel de agarose. É de referir que para todas as amostras se obteve, após a extração, um pellet esbranquiçado correspondente ao DNA genómico, exceto para a amostra L12 para a qual não se observou a formação de um pellet. Mesmo com a adição de lisozima para facilitar a lise das células, esta poderá não ter sido bem-sucedida para esta amostra em particular. Ainda assim, a amostra L12 foi processada.

Na Figura 17 está representado o gel de agarose corado com brometo de etídio, obtido após extração do DNA recorrendo ao um kit comercial Genomic DNA purification kit.

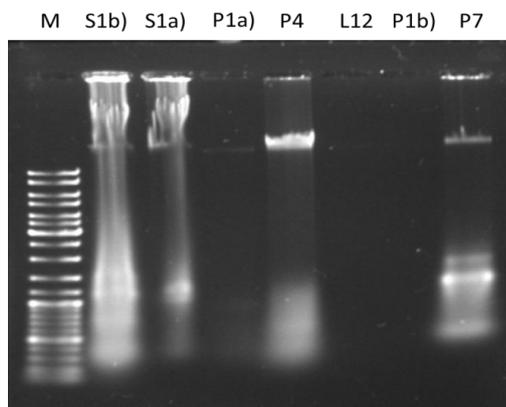


Figura 17. Gel de agarose 0,8% em TBE 1x para as 7 amostras em estudo a par com o marcador de peso molecular (M).

Pelo gel é possível verificar que o marcador molecular teve o comportamento esperado, com várias bandas nítidas e bem definidas, demonstrando que a electroforese foi bem-sucedida. Em relação às amostras e após o carregamento, observa-se para as amostras S1b), S1a), P4 e P7 uma primeira banda que corresponde ao DNA genómico. Destaca-se ainda algum arrastamento no início da corrida devido à existência de contaminantes protéicos e, após a banda correspondente ao DNA genómico, um arrastamento devido à degradação do mesmo. No final do gel, observa-se a presença de RNA pelo aparecimento de uma banda desfocada. Relativamente à amostra P1a) observa-se uma ligeira banda e para as amostra L12 e P1b) não se observa, pelo menos a olho nu, qualquer banda. Assim, após a extracção do DNA total das 7 amostras, obteve-se, apesar de com alguma degradação, uma quantidade satisfatória de DNA para as amostras S1b), S1a), P4 e P7 e uma quantidade bastante inferior para P1a), L12 e P1b). No que diz respeito a estas 3 últimas amostras, o facto de não se verificar, a olho nu, uma banda definida de DNA não significa que este não seja suficiente para a reacção de amplificação.

Após a reacção de amplificação do gene 16S das 7 amostras recorrendo aos “primers” universais 27F e 1942R, foi realizada uma electroforese em gel de agarose 1,5% com o intuito de analisar qualitativamente os produtos da reacção de amplificação, a par com um marcador molecular para confirmação do tamanho destes. Na Figura 18 está

representado o gel obtido, a par com os controlos negativo e positivo e o mesmo marcador de peso molecular anteriormente usado.

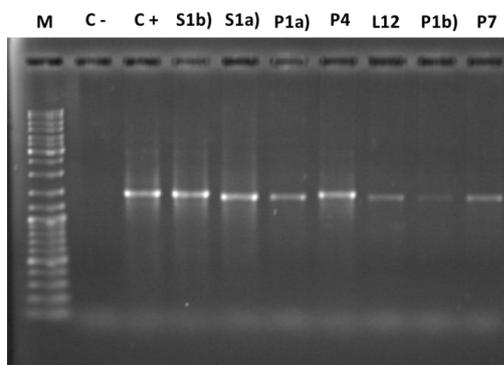


Figura 18. Gel de agarose 1,5% em TBE 1x mostrando as bandas do gene 16S com 1500 pb das 7 amostras amplificadas pelos primers 27F e 1942R, a par com o controlo negativo (c-), controlo positivo (c+) e o marcador de peso molecular (M).

Através da análise da Figura 18 pode verificar-se que o controlo negativo e controlo positivo apresentam o padrão esperado, não se observando banda para o primeiro e observando um padrão de banda nítido correspondente ao comprimento de 1550 pares de bases do gene 16S. Para as 7 amostras em estudo é possível destacar um padrão de banda nítido correspondente ao gene 16S, sem produtos inespecíficos. É de referir que, para as amostras P1a), L12 e P1b) as bandas não são tão intensas, o que indica menos quantidade de DNA, tal como foi observado no gel anteriormente referido.

Depois de confirmados os produtos do PCR, estes foram purificados antes de ser enviada uma amostra de cada produto de amplificação para sequenciação por uma empresa externa. É sabido que o sucesso de uma reacção de sequenciação é dependente da qualidade e pureza do produto de PCR. Deste modo, todo o DNA submetido para sequenciação tem que estar em bom estado e purificado, ou seja livre de contaminantes, como por exemplo, primers, enzimas e dNTPs. Se este procedimento não for efectuado poderão obter-se más sequências devido à interferência desses ou poderá mesmo ocorrer a inibição total da reacção de sequenciação.

Após a receção das amostras, estas foram analisadas no programa FinchTV®-Geospiza (<http://www.geospiza.com/Products/finchtml>), específico para análise de sequências de DNA e, uma vez editadas, foram inseridas no BLAST, “Basic Local Alignment Search Tool” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este último utiliza métodos estatísticos para comparar a sequência-alvo com as sequências existentes no

banco de dados e reporta as sequências que têm um nível significativo de similaridade com a sequência-alvo.

Tabela 8. Resultados da identificação de 5 isolados bacterianos pela sequenciação do gene 16S.

Ponto de colheita	Identificação	Query coverage	E-value	Max. Ident.
S1b)	<i>Sphingomonas sp</i>	99%	0.0	99%
P1a)	<i>Methylobacterium populi</i>	100%	0.0	99%
P1b)	<i>Caulobacter sp</i>	100%	0.0	98%
P4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	0.0	100%
P7	<i>Ralstonia pickettii</i>	100%	0.0	99%

Através deste método e após a análise das sequências foi possível identificar 2 isolados até ao género e 3 isolados até à espécie. Pode observar-se, pela Tabela 8, que para as 5 amostras identificadas a percentagem de cobertura é sempre de 100%, exceto para a amostra S1b) para a qual a percentagem de cobertura foi de 99%, o que continua a ser uma percentagem aceitável. O valor de E-value é zero para todas as amostras e, a percentagem de nucleótidos idênticos para cada uma das sequências-alvo com a da base de dados varia entre 98 e 100%. Assim, pode afirmar-se que os resultados obtidos são estatisticamente fidedignos.

É de referir que a sequenciação das amostras S1a) e L12 não foi bem-sucedida e não foi possível obter qualquer identificação. Para a primeira observou-se, através dos cromatogramas analisados pelo software FinchTV, que a amostra estaria muito possivelmente contaminada. Relativamente à segunda amostra (L12) estes resultados eram já esperados devido aos problemas ocorridos durante o processamento a nível da lise celular.

4. Caracterização dos microrganismos identificados

Pelos métodos bioquímico e molecular foi possível identificar 8 dos 10 isolados bacterianos presentes no sistema de produção de água purificada durante o período de qualificação da performance. Na Tabela 5 do Anexo II estão todas as bactérias identificadas, assim como a taxonomia associada. Tal como descrito no estudo de Tokajian S.T. e colaboradores [50], verifica-se que todas as bactérias identificadas pertencem ao filo

das proteobactérias que é composto por bactérias gram negativas [50]. Dos 8 isolados, 3 pertencem à classe das alfa-proteobactérias, 3 à classe das beta-proteobactérias e 2 à classe das gamma-proteobactérias.

As bactérias pertencentes à classe das alfa-proteobactérias, que inclui a maioria dos fototróficos abundantes em vários ambientes terrestres e marinhos [51], correspondem aos géneros *Sphingomonas sp.*, *Caulobacter sp.* e à espécie *Methylobacterium populi*.

Os 3 géneros supramencionados estão largamente distribuídos pela natureza, sendo que as *Sphingomonas sp.* foram já isoladas a partir de amostras de terra, vários tipos de água, incluindo sistemas de distribuição de água potável [52] e a partir de amostras clínicas [53]. A nível clínico, algumas *Sphingomonas* (especialmente *Sphingomonas paucimobilis*) podem causar uma variedade de infeções nosocomiais, facilmente tratadas recorrendo a antibióticos [53].

Por sua vez, os membros do género *Methylobacterium*, nomeadamente o *Methylobacterium populi*, são microrganismos distribuídos numa ampla variedade de ambientes naturais e artificiais, incluindo solo, ar, sistemas de abastecimento de água e sistemas de ar condicionado [54]. Estes microrganismos são capazes de crescer em compostos com um alto teor em carbono e algumas espécies são agentes patogénicos oportunistas em humanos [54]. A sua presença num sistema de produção de água purificada foi já relatada por Kawai M. e seus colaboradores [36] aquando do estudo de um sistema de fornecimento de águas farmacêuticas. O microrganismo foi identificado após a passagem por filtros de carvão ativado do sistema, levando os autores a sugerir que este possa ser característico da sua flora normal [36].

Relativamente aos organismos do género *Caulobacter* está descrito que estes podem ser isolados a partir de água destilada ou engarrafada, rios, canais e lagoas, ou ainda águas de esgoto [55]. Em 2007, foi descrita, pela primeira vez por Justesen U.S. e seus colaboradores [56], o primeiro caso de infeção num humano causado por este género de microrganismos [56].

No que diz respeito às bactérias identificadas pertencentes à classe das beta-proteobactérias, as 3 pertencem à ordem das *Burkholderiales* e à família *Burkholderiaceae*, sendo que duas são da espécie *Ralstonia pickettii* e uma da espécie *Burkholderia cepacia*. A *Ralstonia pickettii*, já designada por *Pseudomonas pickettii* ou *Burkholderia pickettii*, é ubíqua em ambientes húmidos, tais como solos, rios e lagos [57].

A nível clínico, está identificada como agente patogénico oportunista em infecções nosocomiais, especialmente entre os pacientes imunodeprimidos [58] e em infecções hospitalares associadas à contaminação de materiais [59]. A presença desta bactéria num sistema de água purificada foi já descrita por Kulakov L.A. e seus colaboradores [60] que num estudo de 6 sistemas de produção de água ultrapura identificaram, a par com outras bactérias gram negativas, a *Rastonia picketti* em todos os sistemas estudados e sugeriram que estas possam pertencer à sua flora microbiana típica [60].

A espécie *Burkholderia cepacia* está amplamente distribuída em habitats naturais como solo, rizosfera das plantas, produtos agrícolas e água [61]. Na década de 50, foi classificada como *Pseudomonas cepacia*, no entanto, após uma análise taxonómica molecular foi transferida para um novo género (*Bulkholderia*) [62]. A nível clínico e, tal como a *Rastonia picketti*, tem sido identificada como agente patogénico oportunista entre pacientes imunodeprimidos [61]. Embora a *B. cepacia* não sobreviva em superfícies completamente secas por mais de uma semana pode sobreviver na água durante muitos meses. Torbeck L. e o seu grupo de investigação [61] descreveram recentemente que este microrganismo tem a capacidade de permanecer viável sob condições severas (por exemplo, solventes orgânicos, anti-sépticos, nutrientes baixos, etc) durante muitos meses. Dada a natureza robusta do organismo é importante considerar a severidade da existência deste microrganismo em componentes usados no fabrico de produtos farmacêuticos como equipamentos de fabrico, excipientes ou águas [61].

Finalmente, foram identificados dois isolados pertencentes à classe das gamaproteobactérias, classe que inclui vários grupos de bactérias como as *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* e *Pseudomonadaceae* [63]. O primeiro isolado corresponde a uma *Stenotrophomonas maltophilia* e o segundo a uma *Pseudomonas fluorescens*. A *Stenotrophomonas maltophilia*, previamente denominada por *Pseudomonas maltophilia*, uma das 13 espécies pertencente ao género *Stenotrophomonas* [64]. Caracteriza-se por ter distribuição ubíqua e baixa virulência, porém, nas últimas décadas, tem-se destacado como um patógeno nosocomial emergente, principalmente em pacientes imunocomprometidos [65]. Está já descrita na literatura a presença deste microrganismo em sistemas de produção de água purificada e os autores alertam para que mesmo em estado latente este microrganismo possa manter a sua atividade metabólica, comprometendo assim a qualidade da água [36, 60].

A *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria ubíqua dotada de uma capacidade de adaptação a novos ambientes, sendo-lhe característico a produção de um pigmento fluorescente designado por pioverdina que age como um sideróforo permitindo o crescimento da bactéria mesmo na ausência do ião ferro livre. Este organismo tem um metabolismo extremamente versátil e pode ser encontrada em ambientes como águas superficiais, solos e plantas [66]. Apesar de geralmente ter um baixo nível de virulência, em 1997 quatro pacientes no National Taiwan University Hospital desenvolveram bacteremia causada por esta última [67]. Já nos Estados Unidos, entre 2000 e 2004, foram relatados 35 casos de infecção por *P. fluorescens* [68]. O grupo de investigação liderado por Penna V.T. identificou, aquando de uma monitorização de um sistema de produção de água purificada, bacilos gram-negativos não fermentadores dos géneros *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.* e *Acinetobacter spp.*, e dentro do primeiro género, a *Pseudomonas fluorescens*. Para além de comuns em ambientes naturais são também frequentemente encontrados em sistemas de tratamento de águas, demonstrando a sua adaptação em ambientes com baixa concentração de nutrientes e para uma ampla gama de temperaturas (de 4°C a 42°C) [33]. Por norma, as bactérias do género *Pseudomonas* são muito resistentes a condições extremas e ao encontrarem um ambiente propício à adesão começam a agregar outros microrganismos formando um biofilme [69]. Klausen e colaboradores [70] relataram que os microrganismos da família das *Pseudomonadaceae* predominam nos biofilmes de sistemas de purificação de água e demonstraram que os subprodutos provenientes dos biofilmes podem ter um impacto negativo na qualidade da água [70]. A predominância desta *Pseudomonas* nos biofilmes pode ser consequência da sua capacidade em se multiplicar mais rapidamente ou de produzirem bacteriocinas, o que impede a multiplicação de muitas outras bactérias, oferecendo uma grande vantagem na competição por espaço e nutrientes [33].

Alguns destes microrganismos, apesar de serem vistos, neste âmbito como contaminantes têm algum interesse biotecnológico associado noutras circunstâncias. Foi demonstrado que as bactérias do género *Sphingomonas* possuem capacidades únicas para degradar contaminantes e que poderiam ser utilizadas na remoção e degradação de diversos poluentes e xenobióticos [71]. Pela sua capacidade em sobreviver em ambientes com altas concentrações de carbono, os membros do género *Methylobacterium* estão a ser estudados com o intuito de reduzir as emissões de metano [72].

Várias estirpes de *Ralstonia pickettii* demonstraram ter capacidade para sobreviver em ambientes altamente contaminados com metais, tais como cobre (Cu), níquel (Ni), ferro (Fe) e zinco (Zn), tornando-a candidata para uso em processos de biorremediação [73]. Para além de ser um microrganismo patogénico em plantas e humanos, a *Burkholderia cepacia* tem variadas aplicações a nível agrícola visto que é capaz de quebrar compostos tóxicos encontrados em pesticidas e herbicidas [74]. Para além disso é já considerado um bioagente eficaz na criação de biodiesel, a fim de ajudar a eliminar os resíduos perigosos lançados para a atmosfera pelo diesel [75].

2.3.1.2.4. Conclusões

O principal objetivo de um processo de avaliação da qualidade microbiológica da produção de água purificada para uso farmacêutico consiste em reunir informações acerca do número de microrganismos presentes no sistema e qual a sua patogenicidade. Neste estudo, que correspondeu à etapa de qualificação da performance, os resultados obtidos mostram que, microbiologicamente, a água purificada é produzida pelo sistema de uma forma consistente e com a qualidade pretendida pois todos os parâmetros estudados estão de acordo com as especificações descritas nas guidelines. Não se detetaram não-conformidades, o que demonstra que os mecanismos de controlo aplicados (ex: equipamento UV, o fluxo e a temperatura da água e os processos de sanitização) são capazes de minimizar uma contaminação microbiana e não necessitam de qualquer ajuste.

Todos os microrganismos identificados são comuns em águas até mesmo em sistemas de purificação de água. Ainda que alguns destes microrganismos possam ser agentes patogénicos oportunistas, a maioria dos estudos aponta para que estes representem parte da flora microbiana típica de sistemas de produção de água purificada.

Como referido acima, os métodos de cultura convencionais são usados há mais de 50 anos para a monitorização da qualidade da água, no entanto, o número e as espécies de bactérias detectáveis por cultura são afectados por muitos factores, como por exemplo, a escolha dos meios de cultura e a temperatura de incubação. Estudos recentes descrevem que muitas das bactérias presentes nestes ambientes são viáveis mas não cultiváveis, o que faz com que a metodologia aqui aplicada possa não ter detetado todos os microrganismos existentes no sistema. No entanto, visto que é a metodologia descrita na farmacopeia e que

os resultados foram satisfatórios, o sistema foi considerado apto para ser colocado a uso e foi iniciada a 3ª fase da qualificação da performance com duração de 1 ano.

2.3.2. CONTROLO DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS ESTÉREIS

Como já foi referido, a Bluepharma é uma empresa produtora de produtos não estéreis. Contudo, encontra-se a avaliar a possibilidade de efectuar a manipulação e enchimento assético, “in-house”, de um produto inovador para administração parenteral em humanos que está a ser desenvolvido por uma empresa do Grupo Bluepharma. O produto em causa consiste numa mistura entre um pó e dois solventes orgânicos e será embalado em 2 frascos diferentes, um contendo o pó e outro contendo a mistura dos dois solventes orgânicos. O produto final só será preparado no momento da sua administração ao doente com a adição de uma solução de NaCl (0,9%).

Os medicamentos designados por parenterais, ou injetáveis, são formulações farmacêuticas estéreis que se apresentam sob a forma de soluções, emulsões, suspensões, géis e pós [76]. Na medida em que o fármaco é introduzido diretamente nos tecidos ou corrente sanguínea, a presença de qualquer contaminação microbiológica pode provocar efeitos severos ou até a morte do doente [77]. Por esse motivo, a produção e manipulação de produtos injetáveis está fortemente legislada, obrigando a elevada qualidade, controlo e rigor. Estão descritos os diversos critérios a que um produto injetável tem que obedecer: esterilidade, ausência de partículas em suspensão e pirogénios (endotoxinas), pH, estabilidade e pressão osmótica igual ou muito próxima ao local para o qual o produto está destinado (ex: tecidos ou plasma sanguíneo) [78]. Neste capítulo vão ser discutidos dois destes critérios, a esterilidade e as endotoxinas.

Segundo os documentos de referência, tais como a farmacopeia europeia e as guidelines da FDA, é obrigatório assegurar todas as condições adequadas para proceder à correcta manipulação e enchimento assético do produto e, posteriormente, cumprir todos os ensaios de controlo de qualidade [79, 80]. Visto que, as regulamentações e requisitos são muito diferentes dos exigidos para a manipulação de produtos não-estéreis que são habitualmente produzidos na Bluepharma, foi necessário efectuar um levantamento exaustivo de toda a informação relativa aos requisitos e regulamentações exigidas para a manipulação e enchimento assético de medicamentos estéreis, bem como dos testes que é

necessário implementar para controlo de qualidade microbiológica de um produto injetável. Foi igualmente efectuado um levantamento dos custos associados à implementação deste procedimento na Bluepharma considerando as infra-estruturas e equipamentos actualmente existentes na empresa.

Esta análise constituirá o suporte da tomada de decisão da Administração de implementar o procedimento na Bluepharma ou em alternativa recorrer ao serviço de terceiros (“outsourcing”).

2.3.2.1. MANIPULAÇÃO E ENCHIMENTO ASSÉTICO

A manipulação de soluções estéreis é inevitavelmente complexa pois trata-se de um processo que envolve várias etapas e que, por isso, aumenta as probabilidades de contaminação microbiológica do produto final [81]. Na técnica de enchimento assético de soluções onde não se recorre à esterilização final, a solução é esterilizada por filtração o que faz com que todo o processo posterior tenha que decorrer em ambiente de extrema qualidade (asséptico), de forma a prevenir qualquer contaminação posterior [77, 79]. Assim, têm que ser cumpridos diversos requisitos quer ao nível das instalações, do comportamento e equipamento de protecção individual utilizado pelo pessoal de laboratório e procedimento propriamente dito.

2.3.2.1.1. Instalações

Um dos primeiros requisitos diz respeito ao facto do produto ter que ser obrigatoriamente manipulado em salas classificadas e limpas, de tamanho e qualidade ambiental adequados ao processo [76, 82]. São igualmente importantes todas as áreas adjacentes à sala de manipulação e enchimento, uma vez que, as pessoas, o fluxo de ar, produtos e materiais entre áreas pode também ter impacto na integridade do produto [78].

- Classificação das salas

Existem diferentes classes de salas limpas, que diferem em termos de limites no número de partículas não-viáveis por m^3 e quantidade de microrganismos no ar e superfícies considerados aceitáveis (Tabela 9 e 10).

Tabela 9. Limites do número de partículas presentes no ar para cada classe de sala limpa [82].

Classe	Tamanho de partícula em repouso		Tamanho de partícula em operação	
	0,5µm	5,0µm	0,5µm	5,0µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 320 000	29 000
D	3 320 000	29 000	Não definido	Não definido

Tabela 10. Limites de contaminação microbiológica para cada classe de sala limpa. UFC - unidades formadoras de colónias [82]

Classe	Ar por volumetria (UFC/m ³)	Ar por sedimentação (UFC/4horas)	Placas de contacto (UFC/placa)	Luvas dos operadores (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

O enchimento asséptico tem que decorrer obrigatoriamente em salas de classe B dentro de uma câmara de fluxo laminar de classe A e, as zonas adjacentes devem ser no mínimo da classe C. É de salientar que, a passagem de uma sala de classe D para uma sala de classe A deve ser feita de forma gradual [76, 81-83].

- Cascata de pressões

O gradiente acima referido relativamente à classificação das salas só é eficaz se existir um correto funcionamento da circulação de ar entre as diferentes áreas adjacentes. Assim, o diferencial de pressão verificado entre salas de classe distintas deve estar entre os 10 e os 15 pascal. Desta forma, sempre que se abrir uma porta existirá uma barreira de protecção (o fluxo de ar) que impedirá a entrada de ar das salas menos limpas para as salas mais limpas [76, 79, 83]

Para assegurar que a cascata de pressões funciona corretamente e minimizar a probabilidade de contaminação, o acesso às salas limpas deve ser realizado por meio de um “airlock”. Este define-se como uma área de transferência composta por duas portas dotadas de um sistema “interlock” que assegura que a segunda porta só poderá ser aberta quando a primeira se encontrar fechada [83].

- Fluxo laminar

Para além da cascata de pressões, as áreas onde se realizará o enchimento, ou seja, as áreas de classe A, têm que possuir um fluxo laminar, que consiste num sistema de ventilação que cria um fluxo de ar constante, unidireccional e com velocidade homogénea, evitando a deposição de qualquer partícula. Para tal, o fluxo laminar deve conter um filtro HEPA (High efficiency particulate air) e a velocidade do fluxo deve estar entre os 0,36 e 0,45 m/s [79, 81, 82].

- Sistemas de ventilação

De forma a controlar a qualidade do ar, é recomendado o usos de sistemas HVAC (Heating, Ventilation and Air conditioning) que regulam a temperatura, humidade, pressão, fluxo de ar e qualidade do ar. Este sistema usa pré-filtros, filtros intermédios e filtros HEPA, com capacidade de reter, pelo menos, 99,97% das partículas de diâmetro superior a 0,3µm. O ar da sala está constantemente a ser renovado, e o número de renovações de ar por hora aumenta de acordo com a classe da sala. Por exemplo, para salas da classe B são necessárias, no mínimo, 40 renovações por hora enquanto que para salas da classe A é necessário um mínimo de 300 renovações por hora [79, 82, 83]

2.3.2.1.2. Pessoal

Dada a elevada carga microbiológica, o pessoal de laboratório é a principal fonte de contaminação. Assim, é fundamental que sejam cumpridos os requisitos de equipamento de protecção individual adequados a cada classe de sala limpa. O fluxo de pessoas numa área assética é de extrema importância, sendo que entre cada sala de classe diferente se passa por uma área de fardamento progressivamente mais limpa. É de referir que o pessoal deve ter formação adequado de forma a conseguir cumprir todos os requisitos [77, 83]

2.3.2.1.3. Monitorizações

Uma vez implementados todos os sistemas e procedimentos necessários para poder manipular de forma adequada os produtos estéreis, é fulcral que todos estes passos sejam monitorizados. Dada a criticidade, não são permitidos quaisquer desvios que poderão ter implicações na qualidade do produto final. As principais monitorizações incidem no

sistema HVAC, contagem de partículas e microbiológica. A nível microbiológico, destacam-se as validações de limpeza e monitorizações do ar e das superfícies [81].

2.3.2.1.4. Esterilização por filtração

Após reunidas todas as condições a nível de instalações e pessoal é possível manipular o produto e proceder à sua esterilização.

Sempre que possível é preferível escolher um processo que permita a esterilização do produto na embalagem final que se designa por esterilização final. Dentro dos vários tipos de esterilização descritos na farmacopeia europeia temos: esterilização por vapor, por calor seco ou por radiações ionizantes [84]. Quando a esterilização final não é possível recorre-se à filtração usando um filtro de 0,22 μm que retém as bactérias. Qualquer que seja o método de esterilização escolhido, este tem que ser testado do ponto de vista da sua eficácia, ou seja, tem que ser devidamente validado [85]. Na Figura 19 estão descritos sucintamente os passos necessários para o ensaio de validação.

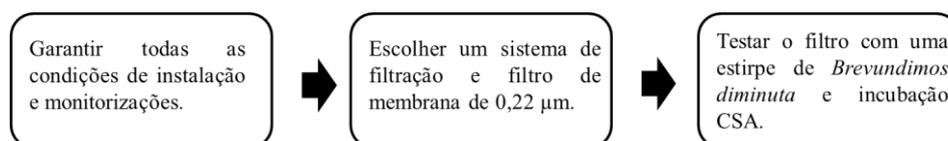


Figura 19. Ensaio de validação do método de filtração para esterilização final de um produto estéril.

O ensaio consiste em testar o filtro escolhido com um microrganismo de dimensões muito reduzidas, neste caso, a *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146, com o intuito de provar que o filtro escolhido é capaz de reter na totalidade este microrganismo, garantindo assim a eficácia do teste para o objectivo pretendido [85, 86]. Depois do processo validado, pode proceder-se à esterilização por filtração das amostra em estudo.

2.3.2.2. TESTE DE ESTERILIDADE

Para qualquer medicamento destinado à administração parenteral tem que ser realizado obrigatoriamente, após a sua esterilização e antes da sua libertação da fábrica, um ensaio de esterilidade como forma de assegurar que o produto é fornecido livre de microrganismos [79, 84, 85]. Nas secções que se seguem estão descritos todos os requisitos e passos necessários para a implementação do teste de esterilidade.

2.3.2.2.1. Condições do teste de esterilidade

O teste de esterilidade deve ser realizado em instalações comparáveis às utilizadas para o enchimento assético, ou seja, em câmaras de fluxo laminar de classe A numa sala limpa de classe B [85, 86]. Caso contrário, se as instalações para a manipulação do produto forem significativamente melhores do que as do teste de esterilidade, podem obter-se falsos resultados positivos, mesmo quando o produto testado possa, na realidade, não estar estéril [79].

2.3.2.2.2. Validação do teste de esterilidade

Como para qualquer outro método de controlo de qualidade, está descrito nas farmacopeias europeia e americana que, para que este possa ser utilizado, tem que ser validado. A validação tem que ser efectuada sempre que o ensaio seja aplicado a um novo produto ou cada vez que sejam modificadas as condições experimentais do ensaio [85, 86]

- Meios de cultura e microrganismos padrão

Recomenda-se o uso de dois tipos de meios de cultura para o ensaio de validação e teste propriamente dito, sendo que, existe a possibilidade de serem utilizados outros, desde que se demonstre a sua equivalência perante os recomendados [85, 86]. Os meios recomendados são os meios líquido de tioglicolato, que se destina principalmente à pesquisa de bactérias anaeróbias e o hidrolisado de caseína e soja, que se destina tanto à pesquisa de fungos e leveduras como de bactérias aeróbias. A composição de ambos está descrita no Anexo I.

Os microrganismos padrão a utilizar estão descritos na Tabela 11. É de salientar que, para além da sua utilização nos ensaios de validação, estes são também utilizados para o controlo das propriedades nutritivas dos meios de cultura tioglicolato e hidrolisado de caseína e soja.

Tabela 11. Microrganismos padrão recomendados para o ensaio de validação do teste de esterilidade e controlo dos meio de cultura [86].

Bactérias aeróbias	Bactérias anaeróbias	Fungos e leveduras
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		

▪ Metodologia

O ensaio de validação do teste de esterilidade é efectuado de forma muito semelhante à validação anteriormente descrita para o oxalato de escitalopram: induzir propositadamente uma contaminação recorrendo aos microrganismos padrão e verificar qual a capacidade do método para a detetar. Relativamente à metodologia, o ensaio de validação pode ser realizado de duas formas diferentes dependendo da composição química do produto: filtração por membrana de poro de 0,22 µm ou através de sementeira direta, ambos com incubação final em meios de tioglicolato e hidrolisado de caseína e soja. O método de filtração por membrana é o método preferencial a utilizar sempre que a natureza do produto o permita. Só caso este não se mostre apropriado se deve utilizar o método por sementeira direta [85, 86]. Os passos de cada método estão descritos sucintamente na Figura 20. De salientar que, a quantidade mínima de amostra a testar está dependente do tamanho total desta por recipiente (Tabela 1 do Anexo III) e que paralelamente às amostras são sempre realizados controlos positivos e negativos.

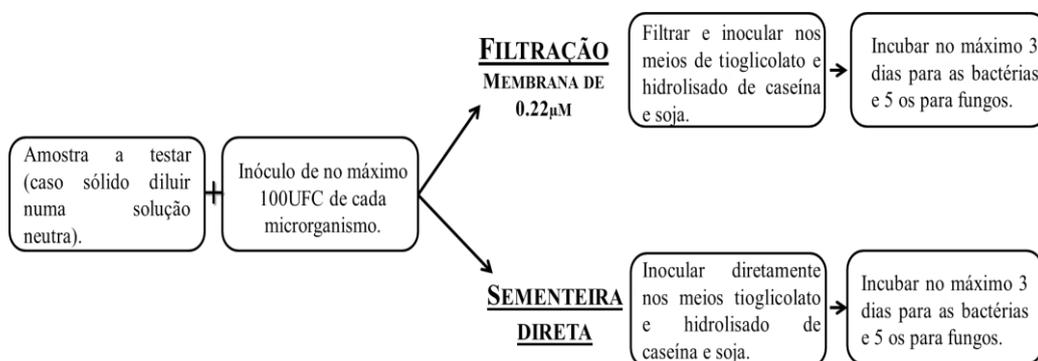


Figura 20. Metodologia disponível para o processo de validação do teste de esterilidade.

▪ Interpretação dos resultados

Se for observado, após o período de incubação, crescimento visualmente comparável dos microrganismos com um padrão positivo, o produto não possui atividade antimicrobiana nas condições do ensaio e o método permite a deteção de microrganismos viáveis. Se, pelo contrário, não se obtiver crescimento microbiano visível, significa que o produto pode ter atividade antimicrobiana não eliminada nas condições do ensaio ou que o

método não é capaz de detetar uma contaminação. Neste caso, têm que ser modificadas as condições e repete-se o ensaio [81, 85, 86].

2.3.2.2.3. Processamento das amostras

A quantidade mínima de amostra a testar é dependente do tamanho da amostra por recipiente e do número mínimo de unidades a controlar que, por sua vez, depende do tamanho do lote produzido [85, 86]. Todas estas indicações estão descritas nas Tabelas 1 e 2 do Anexo III.

Depois de validado o método, as amostras podem ser processadas seguindo o mesmo procedimento descrito na Figura 20, sem a adição de um inóculo de microrganismos e com um período de incubação de 14 dias.

Na Figura 21 está representado um esquema para auxiliar a interpretação dos resultados dos testes de esterilidade após os 14 dias de incubação.

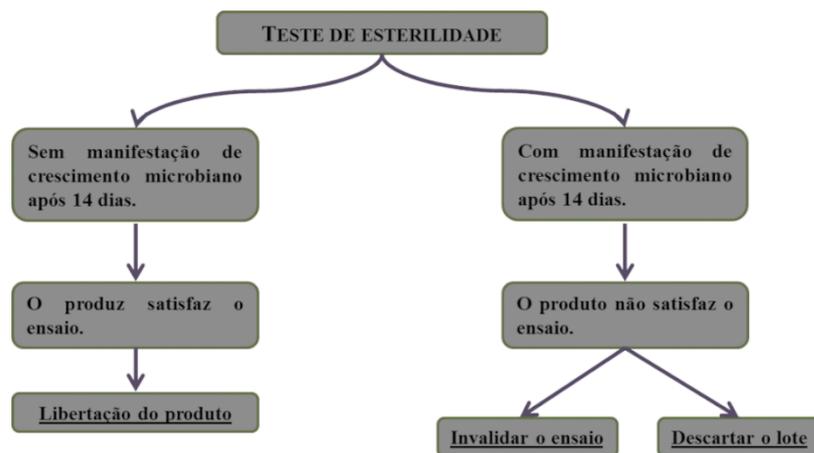


Figura 21. Interpretação dos resultados para o teste de esterilidade após os 14 dias de incubação.

Caso se observe contaminação microbiana após o período de incubação, segundo a farmacopeia europeia o produto não satisfaz o requisito de qualidade, o que resultaria na perda do lote por inteiro, a não ser que se demonstre que o ensaio não foi válido por motivos extrínsecos ao produto. Desta forma, o ensaio só pode ser considerado inválido se, pelo menos, uma das seguintes condições for observada:

- a) Os resultados do controlo microbiológico dos equipamentos utilizados no ensaio apresentaram uma anomalia;

- b) O procedimento experimental utilizado para efectuar o ensaio em questão apresentar uma anomalia (ex: o processo de filtração mal sucedido devido a um refluxo do vácuo durante o processo);
- c) Os controlos negativos apresentaram também crescimento microbiano;
- d) Se após a realização de uma identificação dos microrganismos isolados no final do ensaio, for demonstrado que o crescimento desta(s) espécie(s) é, sem qualquer dúvida, imputável aos materiais e/ou técnicas usadas para a utilização do ensaio de esterilidade (ex: falha no processo de esterilização dos materiais) [85, 86].

Se o ensaio for considerado inválido pode ser repetido no mesmo número de unidades que o ensaio inicial. Caso não sejam observados sinais de crescimento aquando da repetição, a amostra satisfaz o requisito de qualidade. Se, pelo contrário, se observar crescimento microbiano a amostra não satisfaz, e o lote tem que ser descartado [85, 86].

Para além do descrito nas farmacopeias europeia e americana, encontra-se ainda publicada desde 2000 uma guideline da EMA (European Medicines Agency) intitulada “Recommendations on sterility testing” onde é referido que *tem que ser demonstrado, inequivocamente, que o(s) microrganismo(s) isolados a partir do produto é/são idêntico(s) ao(s) microrganismo(s) isolado(s) a partir do material e/ou do ambiente envolvente*. Tal evidência só é possível recorrendo a técnicas de identificação muito sensíveis, tais como, as técnicas moleculares, como por exemplo, a tipificação molecular baseada na percentagem de homologia, com o intuito de estabelecer o parentesco clonal e a origem comum dos microrganismos. Não são permitidas técnicas baseadas em características morfológicas e/ou bioquímicas convencionais, visto que estas nem sempre são fidedignas para demonstrar que 2 isolados são da mesma origem [87].

No âmbito dos testes de esterilidade, as regulamentações são extremamente rigorosas e a invalidação de um resultado positivo num teste de esterilidade é extremamente difícil. Desta forma, o cumprimento de todos os requisitos e procedimentos do teste de esterilidade reveste-se de extrema importância, evitando, assim, perda de tempo e custos associados.

2.3.2.3. DETEÇÃO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Os níveis de pirogénios/endotoxinas são cruciais para a libertação de produtos farmacêuticos para administração parenteral após o fabrico. A importância do controlo da contaminação por endotoxinas no fabrico de produtos injetáveis torna-se evidente pela sua ubiquidade na natureza, a toxicidade em relação aos outros pirogénios, a sua estabilidade ou a capacidade de reter as suas propriedades endotóxicas após ter sido submetida a condições extremas e, à probabilidade da sua ocorrência neste tipo de produtos [88].

Sob o ponto de vista do controlo da qualidade, todos os produtos injetáveis, acessórios para transfusão ou infusão e todos os dispositivos implantáveis ou descartáveis de uso parenteral devem ser submetidos a um ensaio de deteção de endotoxinas [88].

As endotoxinas são complexos lipopolissacarídeos de alto peso molecular, capazes de provocar uma resposta febril. Estão associadas à membrana externa de bactérias Gram-negativas patogénicas e são libertados quando a célula lisa [89]. É de salientar que as endotoxinas são pirogénios, mas nem todos os pirogénios são endotoxinas [89].

As endotoxinas são resistentes à destruição pelo calor, a uma gama alargada de pHs e a vários tratamentos químicos, o que leva a que a validação do processo de destruição ou remoção da endotoxina na produção de injetáveis seja um fator crítico para o fabricante. Para além disso, a toxicidade das endotoxinas não é dependente da célula viva, o que faz com que a esterilização por calor, por substância química ou processos físicos, sejam medidas de controlo ineficazes das endotoxinas na medida em que a destruição das células induz à libertação de endotoxinas a partir da sua parede celular [79].

2.3.2.3.1. METODOLOGIAS PARA DETEÇÃO DE ENDOTOXINAS

A pesquisa de endotoxinas pode ser realizada por várias metodologias que podem ser divididas em dois tipos diferentes: ensaios “*in vivo*” e ensaios “*in vitro*” [88], como descrito na Figura 22.

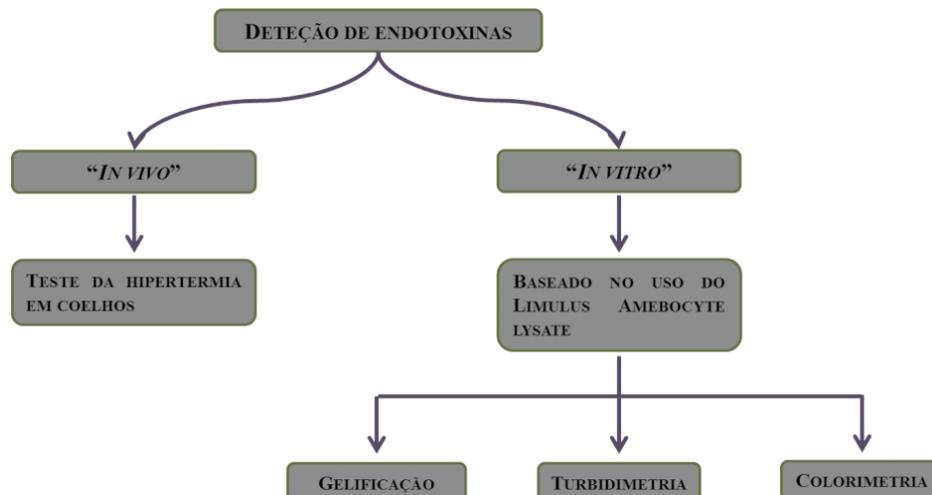


Figura 22. Esquema representativo dos métodos existentes para a deteção de endotoxinas bacterianas.

O teste de hipertermia em coelhos foi o primeiro teste a ser desenvolvido e baseia-se na injeção intravenosa da amostra em análise nestes animais. Pelos critérios das farmacopeias europeia e americana, o ensaio é positivo se for observado um aumento de temperatura nos coelhos superior a 0,5 °C [90]. Este ensaio tem como principais desvantagens ser demorado e não fornecer um resultado quantitativo [91].

O teste mais simples e mais amplamente usado consiste num método “in vitro” denominado teste do lisado de amebócitos de *Limulus* que tem como principais vantagens ser mais económico, preciso e rápido que o teste anterior [91]. Este teste consiste no uso das propriedades de gelificação do reagente LAL (*Limulus amebocyte lysate*) na presença de endotoxinas [92, 93]. O reagente consiste num extrato aquoso dos amebócitos, células sanguíneas da hemolinfa azul da espécie de caranguejo ferradura *Limulus polyphemus* (Figura 1 do Anexo IV), que é composto por enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de endotoxinas [88]. A reacção que leva à formação do gel consiste numa cascata de ativação enzimática [94].

Dentro da metodologia LAL, existem 3 diferentes técnicas baseadas nos princípios de gelificação, turbidimetria e cromogenia [88], descritos na Tabela 12 que se segue.

Tabela 12. Metodologias existentes para realização do Teste de Lisado de Amebócitos de Limulus [88].

TESTE DO LISADO DE AMEBÓCITOS DE LIMULUS			
	GELIFICAÇÃO	TURBIDIMETRIA	CROMOGÉNICO
PRINCÍPIO	Formação de gel	Aumento na turbidez	Reação cromogénica
CARACTERÍSTICAS	Qualitativo ou semi-quantitativo.	Quantitativo cinético ou end-point.	Quantitativo cinético ou end-point.
VANTAGEM	Adequado para baixo número de amostras.	Rápido, simples e sensível.	Rápido, simples e sensível.
DESVANTAGEM	Tempo	Não pode ser usado com amostras que apresentem turbidez.	Não pode ser usado para amostras com cor.

O grande desafio na análise de produtos injetáveis consiste no desenvolvimento de um ensaio de LAL que seja robusto, reprodutível e automatizado para uso rotineiro [88]. É de referir que para todas as técnicas existem kits comerciais associados, e a tendência segue no sentido do desenvolvimento de métodos cada vez mais automatizados, existindo já, nos dias que correm, aparelhos portáteis que permitem a deteção de endotoxinas.

Em 1941, o Comité de Revisão da farmacopeia americana autorizou a realização do primeiro estudo colaborativo sobre pirogénios na divisão de Bacteriologia do FDA e 14 indústrias farmacêuticas. Este resultou na incorporação do primeiro ensaio oficial de pirogénios em coelhos na 12^a edição da farmacopeia americana em 1942 [91]. Após a descoberta das potencialidades do lisado de amebócitos para deteção de endotoxinas, o manual de 1987 da FDA [95], o Teste para Endotoxinas Bacterianas das farmacopeia americana e europeia, descreveram as recomendações acerca dos critérios necessários ao uso do LAL e à validação de produtos para uso humano ou animal [92, 93]

Ao contrário do ensaio com coelhos, o teste do LAL passou a permitir o estabelecimento de limites quantitativos das endotoxinas. O primeiro passo para a realização do ensaio LAL consiste no cálculo do limite de endotoxina do produto injetável. Este é calculado pela seguinte fórmula: K/M , onde K é igual a 5 unidades de endotoxina por Kg de peso corporal, e M é igual à dose máxima humana recomendada do princípio ativo em causa por Kg, que pode ser administrada ao paciente no período de uma hora [92, 96]. Assim, os limites de endotoxina variam de substância ativa para substância ativa, pois dependem da sua dose máxima que pode ser administrada por hora.

Sob o ponto de vista das regulamentações, o teste não tem que ser obrigatoriamente quantitativo. Após a determinação do limite máximo de endotoxinas apenas tem que ser demonstrado que esse teste tem a capacidade de detectar o limite calculado da amostra em estudo [88]. Para efectuar essa demonstração a validação do método, apesar de complexa, é fundamental.

- Validação do método

Os ensaios de controlo necessários para a validação do método consistem em determinar a ausência de fatores de interferência, a sensibilidade do lisado, a solubilidade do produto quando diluído e a destruição da endotoxina que possa estar presente [91].

A validação do ensaio de LAL pretende fornecer garantias que independentemente do método, lote testado, ou número de diluições do produto não há interferências e que a quantificação de endotoxinas numa dada amostra é confiável [92, 93]. O que se valida, neste caso é a amostra e a sua diluição, e não se trata, por exemplo, de realizar ensaios de linearidade, exatidão ou precisão como se descreve para a maioria dos métodos analíticos [91]. Depois do método validado pode proceder-se à análise das amostras.

2.3.2.4. CONCLUSÃO

Como foi demonstrado ao longo deste relatório os requisitos obrigatórios para a manipulação de um medicamento injetável são muitos quer a nível das condições das instalações quer a nível dos procedimentos de controlo de qualidade. Visto que a Bluepharma é fabricante de produtos não estéreis, será necessário proceder a modificações estruturais das instalações de modo a que possam ser realizados todos os ensaios requeridos para assegurar que o produto se encontra estéril e livre de endotoxinas.

Estão em análise várias hipóteses de reestruturação e custos associados a cada. Uma das possibilidades consiste na opção de “outsourcing” ou prestação de serviços a uma entidade externa, especializada na área. A ideia seria a realização do enchimento assético e dos testes de controlo de qualidade, de esterilidade e de deteção de endotoxinas, por outra empresa especializada e certificada. Visto ser um produto inovador, os contratos de confidencialidade assim como certificações da empresa externa são de máxima importância. Desta forma, até ao final do presente estágio foi possível reunir todos os requisitos necessários para manipular e fornecer este produto injetável inovador e

determinar as adaptações necessárias na empresa. Foram compilados os custos associados a estas reestruturações, material necessário para os ensaios de esterilidade e endotoxinas e, propostas de “outsourcing”. Ainda assim, até à elaboração deste trabalho não foi tomada uma decisão pela falta de algumas informações dependentes de terceiros.

2.4. A MICROBIOLOGIA NA CULTURA DE CÉLULAS

É sabido que, em cultura de células, nenhum problema é tão universal como a perda das mesmas devido a contaminação. A contaminação pode ser de natureza química ou biológica, visível ou invisível e todos os tipos de contaminações têm graves consequências na qualidade das células [97].

Os contaminantes químicos podem ter origem no meio de cultura utilizado, nos reagentes e na água utilizada para o fabricar, assim como no soro. Por sua vez, os contaminantes biológicos podem ser divididos em dois grupos: os facilmente detetáveis – bactérias e leveduras, e os dificilmente detetáveis – vírus, protozoários e *Mycoplasma spp.* [98]. As bactérias e leveduras têm uma presença ubíqua e capacidade para colonizar rápida e eficientemente o ambiente celular [97]. Devido ao seu pequeno tamanho, taxas de crescimento elevadas são os contaminantes biológicos mais frequentes na ausência de antibióticos. Alguns dos contaminantes são silenciosos pois chegam a existir em altas concentrações, alterando tardiamente o crescimento celular e comprometendo todos os resultados experimentais obtidos o que leva à perda de tempo, recursos financeiros e esforço por parte do investigador/analista [97, 98].

2.4.1. O *MYCOPLASMA SPP.*

O *Mycoplasma spp.* foi detetado pela primeira vez em 1956 em culturas celulares por Robinson e seus colaboradores [99]. Estes contaminantes biológicos, representados na Figura 23, constituem um grande grupo de microrganismos caracterizados pelo facto de não possuírem uma parede celular rígida. Em vez disso possuem uma membrana plasmática muito flexível que torna estes microrganismos muito flexíveis ao meio ambiente, mas sensíveis às

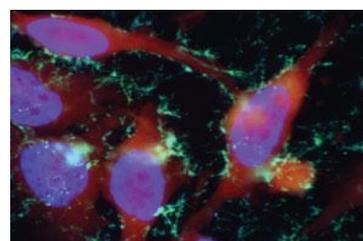


Figura 23. Análise por FISH de células HeLa. DNA genómico de *Mycoplasma fermentans* a verde [99].

influências químicas. São considerados os organismos autorreplicativos mais pequenos, factor que aliado à flexibilidade da sua membrana, justifica a passagem destes através dos poros de filtros anti-bacteriológicos de 0,22 μm [100]. Contrariamente a outras bactérias, os *Mycoplasmas* crescem lentamente, mesmo em condições ideais. O tempo de replicação varia geralmente de 1 a 3 horas, podendo prolongar-se até 9 horas, devido à sua fase *lag* muito longa. Contudo, uma única célula de *Mycoplasma* pode, numa cultura de células, multiplicar-se em 10^6 unidades formadoras de colónias por mL em 3 a 5 dias [97]. Este organismo é ainda caracterizado por fazer com que a sua replicação dependa, em grande parte, de compostos nutricionais fornecidos pelo hospedeiro ou meio envolvente. Estudos mais recentes têm demonstrado, de forma inequívoca, uma localização intracelular deste contaminante biológico nas culturas celulares o que pode dificultar a eficácia das técnicas de prevenção da contaminação e/ou dificultar a sua deteção [97, 98]

Nas décadas de 80 e 90, quando o *Mycoplasma spp.* era ainda considerado inofensivo, e segundo dados do FDA, ATCC e outras empresas da área, pelo menos 11 a 15% das culturas celulares nos Estados Unidos estavam infetadas com *Mycoplasma spp.* [101]. A nível europeu, as percentagens eram ainda mais elevadas com 25% de 1949 culturas analisadas nos Países Baixos e 37% de 327 na República Checa contaminadas [102]. De referir que, neste último caso, se descobriu que, 100% das culturas em laboratórios sem análise para deteção de *Mycoplasma spp.* estavam contaminadas, mas em laboratórios que o faziam esta percentagem baixava para os 2%. Outras estatísticas apontam ainda que, nas mesmas décadas, 65 % das culturas em laboratórios argentinos e 80 % no Japão estivessem contaminadas por este organismo [101].

As infeções causadas por *Mycoplasma spp.* podem ter uma miríade de efeitos sobre as culturas de células, porém células diferentes são afectadas de forma e graus diferentes. A maioria das espécies de *Mycoplasma spp.* produz graves efeitos citopáticos e podem interferir em praticamente todos os parâmetros relacionados com a viabilidade celular, causando alterações nos níveis protéicos, na síntese de DNA e RNA, no metabolismo e morfologia celular e, no crescimento e viabilidade celular. Assim, na maioria dos casos, a contaminação por micoplasma tem como consequência a perda total da cultura celular [98].

Tabela 13. Espécies de *Mycoplasma* mais comuns em culturas celulares [97].

Species	Frequency	Natural host
<i>M. orale</i>	20–40%	Human
<i>M. hyorhinae</i>	10–40%	Swine
<i>M. arginini</i>	20–30%	Bovine
<i>M. fermentans</i>	10–20%	Human
<i>M. hominis</i>	10–20%	Human
<i>A. laidlawii</i>	5–20%	Bovine

Atualmente, foram já analisadas dezenas de milhares de culturas celulares e verificou-se que as culturas de células primárias, são menos frequentemente contaminadas, quando comparadas com as linhas celulares contínuas [98]. Assim, as amostras de tecido usadas para iniciar uma cultura de células não parecem representar as principais fontes de contaminação. Na medida em que a maioria das contaminações por *Mycoplasma spp.* encontradas em culturas de células são de origem humana, pode pressupor-se que o pessoal de laboratório seja uma das principais fontes desta contaminação. Por outro lado, a alta incidência de espécies como *M. laidlawii* e *M. arginini* aponta ainda o soro fetal bovino como fonte de contaminação importante (Tabela 13). Estudos das décadas de 60 e 70 demonstraram que 25 a 40% dos lotes de soro comerciais fornecidos estavam contaminados. Contudo, nas últimas décadas estes números diminuíram drasticamente graças aos processos de certificação dos fornecedores [101]. As próprias linhas celulares infetadas são, por si só, a fonte mais importante de disseminação de uma contaminação nas salas de cultura, pela facilidade com que se geram gotas durante a manipulação e devido à alta concentração de *Mycoplasma spp.* quando presente numa cultura [97].

Pelo que foi dito anteriormente, torna-se claro que a presença deste microrganismo em culturas celulares não pode ser ignorada e considerada como inofensiva. Além da perda da cultura, todos os resultados anteriores à deteção da contaminação ficam comprometidos, o que faz com que a deteção da presença de *Mycoplasma spp.* em culturas celulares e reagentes associados seja imprescindível em qualquer laboratório de investigação.

2.4.2. IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO DE DETECÇÃO DE MICOPLASMA EM CULTURAS CELULARES NA BLUEPHARMA

Antes da implementação do método de deteção do micoplasma em culturas celulares na Bluepharma foi feita uma pesquisa exaustiva sobre as diferentes técnicas disponíveis no mercado, equipamento necessário para a sua execução, vantagens e desvantagens de cada método identificado, custo associado por análise e informações descritas nas guidelines relevantes (Farmacopeias, FDA e EMA).

Após a análise cuidada de todas estas informações foram eliminados imediatamente alguns métodos que não eram adequados aos objectivos da Bluepharma e para os restantes métodos foi elaborada uma análise SWOT (S-Strengths; W-Weaknesses; O- Opportunities; T-Threats) para auxiliar a tomada de decisão de implementar ou não um método na Bluepharma e se sim qual o método que deveria ser implementado para detecção do *Mycoplasma spp.* nas culturas celulares da empresa (ver Figura 24).

A análise SWOT facilitou a escolha do método mais apropriado para a empresa considerando o seu custo-benefício (vantagens e desvantagens dos métodos e a sua relação com o investimento inicial necessário por parte da empresa e o custo do teste por amostra analisada).

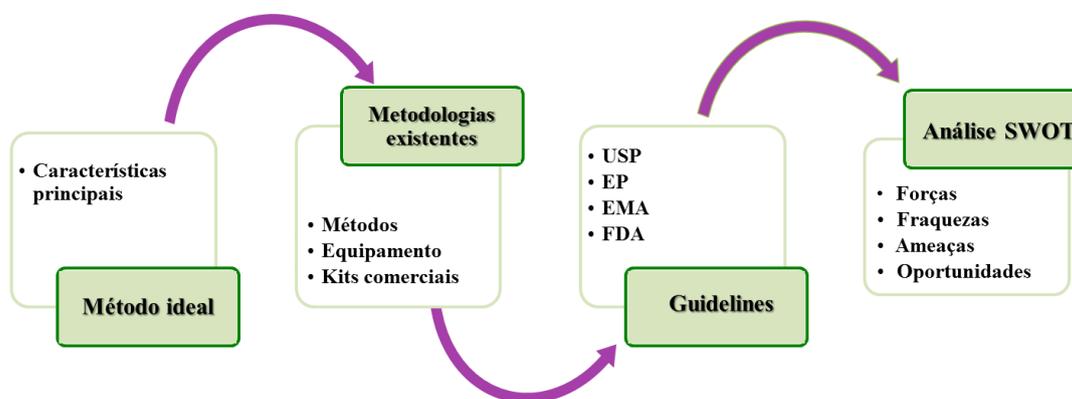


Figura 24. Esquema representativo do processo seguido para a selecção de um método para a detecção de *Mycoplasma spp.*

2.4.2.1. Metodologias para detecção de *Mycoplasma spp.* em culturas celulares

O método de detecção ideal é aquele que demonstra ser não só altamente sensível e específico, mas também simples, rápido, eficiente e económico. A avaliação da adequabilidade de qualquer método para o objectivo pretendido deve contemplar as características de validade e reprodutibilidade referentes aos parâmetros estatísticos sensibilidade (deteção de verdadeiros positivos), especificidade (deteção de verdadeiros negativos) e precisão (combinação da sensibilidade e especificidade) [98, 103].

Uma vasta gama de metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de detetar possíveis contaminações por *Mycoplasma spp.* em culturas de células. A maioria destes métodos são relativamente demorados e envolvem avaliações subjetivas [103]. Na Tabela 14 estão reunidas as metodologias que foram encontradas para detecção de micoplasma em

cultura de células bem como uma breve descrição da técnica e as desvantagens e vantagens associadas a cada uma delas. Estas metodologias baseiam-se em 6 tipos de abordagens: microbiológica [104], por marcação de DNA [98], recorrendo à técnica de PCR [100], Bioquímica [105], Imunológica [105] e Colorimétrica [104].

Tabela 14. Metodologias para deteção de micoplasma em culturas celulares e vantagens e desvantagens associadas.

ABORDAGEM	TÉCNICA	VANTAGEM	DESvantAGEM
Microbiológica	Cultura em agar e meio líquido específico	Tem alta sensibilidade e só deteta microrganismos viáveis.	Análise difícil Tempo de incubação muito longo: 28 dias.
Marcação de DNA	DAPI stain	Ideal para estirpes não cultiváveis.	Sensibilidade reduzida.
PCR	RT-PCR, Regular PCR, Touchdown PCR	Rápido, específico e sensível.	Não discrimina entre microrganismos viáveis e não viáveis.
Bioquímica	Enzimático	Rápido, simples e sensível.	Não permite a identificação da espécie.
Imunológica	ELISA	Muito específico.	Uso limitado devido à falha de anticorpos comerciais.
Colorimétrica	Hibridação do RNA 16S	Muito simples e rápido.	Só permite deteção de 8 espécies.

2.4.2.2. Recomendações/Guidelines

Tanto as farmacopeias europeia e americana, como a EMA elaboraram recomendações acerca do ensaio de deteção de micoplasma. São estes documentos que fornecem orientações relativas às amostras a analisar, periodicidade das análises e métodos de deteção. Apesar desses documentos possuírem pequenas diferenças, as três entidades recomendam o uso de um de três métodos: microbiológico, por marcação de DNA ou PCR [106-108].

Relativamente às amostras que devem ser analisadas, as guidelines recomendam que sejam testadas todas as novas linhas celulares, células em cultura, materiais e/ou reagentes (ex. meio de cultura) e bioprodutos celulares. Em termos da periodicidade das análises é recomendado um teste de rastreio a cada nova linha celular que chegue ao laboratório para controlo de qualidade e de forma a minimizar quaisquer riscos de contaminações cruzadas com as linhas já existentes em laboratório. Para as linhas celulares já existentes no laboratório, as orientações recomendam uma análise mensal, antes e após

cada descongelação e, ainda, sempre que houver uma suspeita de contaminação [106-108].

2.4.2.3. Discussão

Após o levantamento destas informações acerca das metodologias existentes para detecção do *Mycoplasma spp.* e recomendações das guidelines disponíveis sobre o assunto foi possível elaborar uma análise SWOT como ferramenta de apoio à tomada de decisão de qual o método mais adequado para implementar na Bluepharma .

Na Figura 1 do Anexo V encontra-se a análise SWOT para todas as metodologias acima descritas. Perante a análise, foi possível aferir rapidamente que os métodos baseados nas técnicas de PCR e ensaios imunológicos envolveriam custos elevados pela aquisição de equipamento e anticorpos, respectivamente. Verificou-se ainda que os métodos microbiológico e por marcação de DNA, só se tornam eficientes quando usados em simultâneo e, ainda assim, são necessários 28 dias para obter um resultado, o que não é um tempo razoável para a obtenção de resultados sobre uma contaminação de *Mycoplasma spp.* num laboratório de cultura de células. Após a eliminação destes métodos pelos motivos enumerados , a avaliação passou a centrar-se nos testes bioquímico (enzimático) e colorimétrico. Os dois testes encontram-se disponibilizados no mercado na forma de kits comerciais. Considerando o custo, o número de ensaios por kit, a fiabilidade, as condições de armazenamento e equipamento necessários a Administração entendeu que o método que melhor preenchia os objectivos da empresa era o método bioquímico sob a forma do kit comercial MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basileia, Suíça).

O kit de detecção MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit fornecido pela Lonza (Figura 25) é um teste bioquímico seletivo que se baseia na actividade de certas enzimas presentes no *Mycoplasma spp.* É sabido que os micoplasmas têm uma via respiratória truncada o que faz com que as vias de fermentação dos hidratos de carbono e arginina sejam as responsáveis pela geração de ATP [109]. Deste modo, enzimas, tais como, as acetato e carbamato aquinase associadas a estas processos estão constantemente a ser expressas a níveis elevados, tornando-se bons marcadores para a detecção deste contaminante. Ao medir o nível de ATP numa amostra antes e depois da adição de um



Figura 25. Imagem representativa do MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basileia, Suíça).

substrato MycoAlert®, pode obter-se uma razão indicativa da presença ou ausência de *Mycoplasma spp.* Se as enzimas não estiverem presentes, a segunda leitura não mostra nenhum aumento do nível de ATP em relação ao primeiro, enquanto que se houver contaminação por micoplasma a reacção com o substrato gera elevados níveis de ATP. Este aumento de ATP é detectado utilizando a reacção bioluminescente representado na Figura 26.

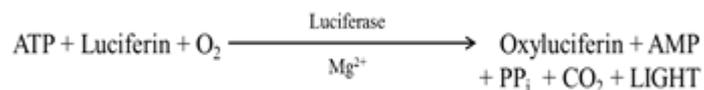


Figura 26. Reacção de bioluminescência que permite detetar o aumento de ATP gerado na presença de *Mycoplasma spp.* num ensaio com o kit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit. [108].

É de salientar que, para a leitura das reacções será utilizado um luminómetro do tipo LMAX II, do laboratório de Bioquímica do CNC (Centro de Neurociências e Biologia Celular), Instituto de Investigação, ligado à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e onde são já realizados alguns testes referentes à investigação conduzida na Bluepharma. Este equipamento com leitura em microplaca permite uma grande sensibilidade, flexibilidade, capacidade de automação e as ferramentas de validação exigidas por laboratórios líderes de hoje. As aplicações incluem ensaios de genes repórter single e luciferase, ATP, dsDNA e luminescência baseados em ELISA.

Aquando da aquisição do kit foi necessário elaborar um procedimento interno da empresa que contempla, para além do princípio e procedimento experimental, as responsabilidades das pessoas que executam e que supervisionam o teste. Neste documento estão ainda informações acerca de condições de armazenamento, segurança e medidas a tomar no caso de obtenção de um resultado positivo. É fundamental que estejam descritos todos os passos necessários para garantir a total eliminação do microrganismo da sala de cultura, caso presente, de forma a minimizar quaisquer riscos de contaminação cruzada. Ficou estabelecido que no caso de se confirmar uma contaminação por *Mycoplasma spp.*, todos os equipamentos, materiais e superfícies com as quais a amostra tenha contato têm que ser descontaminadas, recorrendo a autoclavagem e desinfeção com álcool a 70%.

2.4.2.4. Ensaio de sensibilidade do luminómetro para kit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit

Após a elaboração da documentação necessária, procedeu-se, antes da primeira análise, a um ensaio de linearidade com o intuito de testar o limite de sensibilidade do luminómetro para o controlo positivo adquirido (MycoAlert® Assay Control) e demonstrar a adequação deste para realização, em rotina, do teste de deteção de *Mycoplasma spp.*

A) Amostras

Para o ensaio de linearidade, prepararam-se 4 diluições do controlo positivo MycoAlert® Assay Control adquirido (1:2, 1:4, 1:8, 1:16), usando o tampão MycoAlert® Assay Buffer recomendado.

B) Método

Pipetou-se um volume total de 100 µl para cada poço de uma placa de 96 poços de alvéolos brancos (Corning Incorporated, Nova Iorque, Estados Unidos) e adicionou-se, de seguida, o reagente MycoAlert® Reagent e o substrato MycoAlert® Substrate. A leitura foi efetuada no Luminómetro LMAX II 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) e o tempo de leitura foi de 1 segundo.

C) Resultados e Discussão

Nas informações relativas ao kit disponibilizadas pelo fabricante, está descrito que, a interpretação dos resultados é feita de acordo com a razão obtida entre as leituras antes e após a adição do MycoAlert® Substrate. Está definido que, uma razão inferior a 1 significa que a amostra não está contaminada e uma razão superior a 1 indica que o resultado é positivo para contaminação por *Mycoplasma spp.* Para valores próximos de 1 (i.e. 0,9 ou 1,2) deve proceder-se a nova análise 24h após a primeira análise ou ainda, aumentar o tempo de leitura de 1 segundo até um máximo de 10 segundos para as amostras ligeiramente abaixo de 1.

Os resultados das leituras para o ensaio de sensibilidade estão descritos na Tabela 1 do Anexo V. Verifica-se, pela Tabela 15, que para todas as diluições testadas a razão obtida é muito superior a 1 e a do controlo negativo muito inferior a 1.

Tabela 15. Resultados obtidos, na forma de razão, para o ensaio de linearidade do luminómetro testando as várias diluições do controlo positivo.

	Controlo positivo	Controlo 1:2	Controlo 1:4	Controlo 1:8	Controlo 1:16	Controlo negativo
Razão	33,25	14,96	6,825	3,612	1,756	0,152

Para o controlo positivo MycoAlert® Assay Control não diluído, obteve-se uma razão igual a 33, que diminui linearmente à medida de este é diluído em MycoAlert® Assay Buffer. Nas instruções do fabricante é dito que devem obter-se razões superiores a 1 para amostras de controlo diluídas até 8 vezes. Se tal não acontecer, o luminómetro não tem sensibilidade suficiente. Pela Tabela acima pode observar-se que até na amostra diluída 16 vezes se obtém um valor consideravelmente acima de 1. Desta forma, fica comprovado que se pode utilizar o luminómetro LMAX II 384 do laboratório de Bioquímica do CNC pois assegura a sensibilidade e confiança em resultados posteriores.

2.4.2.5. Detecção de micoplasma pelo kit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit

A) Amostras

Nesta primeira análise foram testadas 8 amostras:

- 4 linhas celulares descongeladas: CT 26, A-549, HT-29 e PC-3
- 2 linhas celulares em cultura: CT26 e A-549
- 2 meios de cultura: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI).

B) Método

Um volume de 2 mL de cada amostra foi centrifugada a 200g durante 5 minutos numa centrífuga Eppendorf 5417R (Eppendorf, Nova Iorque, Estados Unidos) e o sobrenadante transferido para a placa de 96 poços acima referida. Todas as amostras foram testadas em duplicado e foram seguidas as instruções do fabricante, com a adição do MycoAlert® Reagent, seguida da adição do MycoAlert® Substrate. A leitura de 1 segundo foi efetuada no Luminómetro LMAX II 384 (Molecular Devices, Estados Unidos).

C) Resultados e Discussão

Todos os resultados obtidos para as amostras em estudo estão descritos na Tabela 1 do Anexo V. Pela Tabela 16, é possível verificar que para todas se obtiveram razões bastante inferiores a 1, o que significa que tanto as linhas celulares como os meios de cultura se encontravam livres de *Mycoplasma spp.*

Tabela 16. Resultados obtidos, na forma de razão, para as amostras em estudo.

	CT26 (nova)	CT26 (em cultura)	A549 (nova)	A549 (em cultura)	HT29 (nova)	PC-3 (nova)	DMEM (meio de cultura)	RPMI (meio de cultura)
Razão	0,554	0,519	0,525	0,524	0,450	0,440	0,536	0,430

Relativamente às amostras em estudo, todas se mostraram livres de *Mycoplasma spp.*, demonstrando que, tanto o procedimentos de descongelamento como a manipulação de linhas e/ou culturas celulares são realizados de forma correta na empresa. O mesmo é válido para os meios de cultura, indicando que o modo de preparação destes é realizado de forma correcta.

2.4.2.6. Conclusões

Pelos resultados discutidos acima, pode concluir-se que o luminómetro utilizado é apropriado para a realização dos ensaios de deteção de *Mycoplasma spp.* utilizando o MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit. Este ensaio demonstrou ser , tal como previsto na análise SWOT, de fácil e rápida execução, o que comprovou a sua adequação para uma análise de rotina que se pretende realizar na sala de cultura de células da Bluepharma.

Assim, a escolha e implementação do método de deteção de *mycoplasma spp.* na Bluepharma foram bem sucedidas.

É de salientar, que é fulcral cumprir todas as normas e boas práticas do laboratório na cultura de células pois a melhor estratégia para combater uma contaminação por *Mycoplasma spp.* continua a ser a prevenção.

CAPÍTULO 3. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estágio visou a aplicação da microbiologia em 2 áreas diferentes da Bluepharma: o controlo de qualidade e a investigação. Todas as atividades estabelecidas foram concluídas com sucesso:

- a) Foi possível validar um método para avaliação microbiológica da substância ativa oxalato de escitalopram que contempla a determinação de microrganismos viáveis totais (bactérias aeróbias, fungos e leveduras) e a determinação do microrganismo específico *E.coli*.
- b) A etapa II de qualificação de performance do sistema de produção de água purificada foi bem-sucedida, visto que, se demonstrou que a qualidade da água produzida alcança todos os requisitos descritos nas guidelines e farmacopeias. Não se observou qualquer desvio no número de microrganismos viáveis ao longo dos pontos importantes do sistema e todos os microrganismos identificados pelas técnicas bioquímica e molecular são típicos destes ambientes, podendo constituir parte da flora microbiana do sistema. O sistema foi colocado a uso mas as análises microbiológicas continuarão a decorrer com o intuito de completar a etapa 3 da qualificação de performance com duração de um ano e que tem como objetivo monitorizar o sistema e identificar a sua flora microbiana típica.
- c) Foram reunidas as informações relativas aos requisitos para a manipulação e enchimento assético de produtos estéreis e estudados ao pormenor os testes de esterilidade e deteção de endotoxinas. Tornou-se evidente que a manipulação de estéreis é dependente de regulamentação muito exigente a nível de infra-estruturas e testes de controlo de qualidade. A fase seguinte será a tomada de decisão por parte da Administração da estratégia a ser seguida pela empresa neste âmbito.
- d) A implementação do método de deteção de *mycoplasma spp.* em culturas celulares foi concluída com sucesso visto que foi escolhido um kit comercial, o MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, que demonstrou ter um bom desempenho e ser adequado para a análise de rotina que se pretende realizar na sala de cultura de células da Bluepharma. Na primeira análise, todas as amostras se mostraram livre deste microrganismo, o que demonstra que os procedimentos de manipulação de linhas e/ou culturas celulares são realizados de forma correta na empresa.

Como considerações finais, tem-se que os objetivos globais do presente estágio foram alcançados, tanto a nível pessoal como profissional. A Bluepharma possibilitou através de todos os meios, pessoas e condições que este estágio se tenha revelado muito enriquecedor e tenham sido desenvolvidos os três grandes saberes: o saber-saber, o saber-fazer e o saber-ser.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CIEF, *Viagem à indústria farmacêutica*. Centro de estudos da Indústria Farmacêutica, APIFARMA, 2011.
2. IMS, *Generic Medicines: Essential contributors to the long-term health of society*. IMS health, 2010.
http://www.imshealth.com/imshealth/Global/Content/Document/Market_Measurement_TL/Generic_Medicines_GA.pdf. Consultado a 22 de Dezembro de 2012.
3. IMS, *Market prognosis.*, 2011, IMS health.
http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Insights/IMS%20Institute%20for%20Healthcare%20Informatics/Global_Use_of_Medicines_Report.pdf. Consultado a 22 de Dezembro de 2012.
4. EFPIA, *The Pharmaceutical Industry in Figures*, European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, 2009.
<http://www.efpia.eu/Content/Default.asp?pageid=559&docid=4883>. Consultado a 5 de Janeiro de 2012.
5. Carvalho, L., *Inovação e I&D na indústria farmacêutica portuguesa – Caso Bial*, in *Faculdade de Economia 2007*, Universidade do Porto.
6. INFARMED, *O mercado de medicamentos genéricos em Portugal e na Europa*. Autoridade Nacional do medicamento e produtos de saúde I.P., 2008.
http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/GENERICOS/QUOTAS_GENERICOS. Consultado a 5 de Janeiro de 2012
7. INFARMED, *Mercado Total e Mercado de Medicamentos Genéricos*. Autoridade Nacional do medicamento e produtos de saúde I.P., 2011.
http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/GENERICOS/ARTIGOS_OPINIAO/WO_medgen_DCI.pdf. Consultado a 5 de Janeiro de 2012.
8. Bomblies, L., *Examination of microbiological quality of pharmaceutical raw materials*. Pharmeur Sciences Notes, 2004. **1**: p. 7-9.
9. WHO, *Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles*. World Health Organization, 2011.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546190_part1.pdf. Consultado a 12 de Janeiro de 2012.
10. EDQM, *European Pharmacopoeia 7.0.*, European Directorate for the Quality of Medicines 2011.
11. PMDA, *The Japanese Pharmacopoeia sixteenth edition*, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2011.
12. USP, *USP 34 –NF 29 main edition*, United States Pharmacopoeia, 2011.
13. Jimenez, L., *Microbial contamination control in the pharmaceutical industry*. Vol. 142. 2004, New York: Marcel Dekker, Inc.

14. Hugo, W.B., *Pharmaceutical Microbiology*. Sixth edition. ed. 1998, Finland: Blackwell Science Ltd.
15. Jimenez, L., *Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2007. **61**(5): p. 383-399.
16. Ragfunandanan, R., *Validation aspects of solid dosage forms*. Pharma Times 2009. **41**(4): p. 1-6.
17. European Pharmacopoeia, *Chapter 2-6-12: Microbial examination of non-sterile products - microbial enumeration tests*. 7th ed. 2011.
18. Martínez, J.E. *Microbial Bioburden on Oral Solid*. Pharmaceutical Technology, 2002. 58-68.
19. USP, "*Chapter <61>: Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests*". United States Pharmacopoeia, 2011.
20. Sutton, S., *Validation of alternative microbiology methods for product testing - quantitative and qualitative assays*. Pharmaceutical Technology., 2005, p. 118-122.
21. Malin, P., S.P. Wengel, and W.J. Burke, *Escitalopram: better treatment for depression is through the looking glass*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2004. **4**(5): p. 769-779.
22. Munoz-Bellido, J.L., S. Munoz-Criado, and J.A. Garcia-Rodriguez, *Antimicrobial activity of psychotropic drugs: Selective serotonin reuptake inhibitors*. International journal of antimicrobial agents, 2000. **14**(3): p. 177-180.
23. Mahamoud, A., *et al.*, *Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **59**(6): p. 1223-1229.
24. Doléans-Jordheim, A., *Efflux pumps: their role in Staphylococcus aureus antibiotic resistance*. Journal of Bacteriology, 2008. **172**: p. 4048-4055.
25. European Pharmacopoeia, *Chapter 2-6-13: Microbial examination of non-sterile products - Microbiological examination of non-sterile products - tests for specified micro-organisms*. 7 ed. 2011.
26. USP, *Chapter <62>: Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Tests for Specified Microorganisms*, United States Pharmacopoeia, 2011.
27. Scognamiglio, T., *et al.*, *Comparison of Inhibitory Mold Agar to Sabouraud Dextrose Agar as a Primary Medium for Isolation of Fungi*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. **48**(5): p. 1924-1925.

28. Bohnert, J.A., *et al.*, *Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. **66**(9): p. 2057-2060.
29. EMA, *Note of guidance on quality of water for pharmaceutical use*. European Medicines Agency, 2002.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003394.pdf. Consultado a 7 de Janeiro de 2012.
30. WHO, *Good manufacturing practices: water for pharmaceutical use*. World Health Organization, 2005.
http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS929/WHO_TRS_929-Annex3.pdf. Consultado a 7 de Janeiro de 2012
31. Kunio, K. *Qualification of water and air handling systems*. Informa Healthcare 2003.
<http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203912119.ch12>. Consultado a 7 de Janeiro de 2012.
32. Moreno, A.H., *Avaliação da qualidade da água purificada em farmácias magistrais da região de São José do Rio Preto*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2011. **32**(1): p. 69-75.
33. Silva, C.H., *Characterization of biofilms formed in filters of activated coal of purification water systems in clinical laboratories*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 2006. **38**(4): p. 243-253.
34. Silva, C.H., *Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 2006. **38**(4): p. 243-253.
35. Penna, V., S. Martins, and P. Mazzola, *Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system*. *BMC Public Health*, 2002. **2**(1): p. 13.
36. Kawai, M., *et al.*, *Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*. *J Appl Microbiol*, 2004. **97**(6): p. 1123-1131.
37. Tunner, J., *Design, Qualification and Performance of a cost-effective water purification system for a GMP pilot plant*. *Pharmaceutical Engineering* 2006. **26**(4): p. 1-8.
38. HSA, *Water systems for manufacturers of non-sterile products*. Health Sciences Authority, 2008.
39. FDA, *Guideline on general principles of process validation*. Food and Drug Administration, 1987.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>. Consultado a 15 de Janeiro de 2012.

40. FDA, *Practical guidelines for qualifying purified water systems*. Food and Drug Administration, 2007.
<http://www.pharmtech.com/pharmtech/Validation/article/detail/480191>. Consultado a 16 de Janeiro de 2012.
41. Pahwa, R., *Validation aspects of water treatment systems for pharmaceutical products*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2010. **9**(1): p. 81-90.
42. Ravagnani, M.A.S.S. *Water purified systems validation in a pharmaceutical industrial proces*. 2005.
43. Khutia, A.R., *Validation of water purification system for pharmaceuticals*. International Journal of Pharmacology and Technology Research 2010. **2**(2): p. 1395-1397.
44. Clarridge, J.E., *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Clinical Microbiology Reviews, 2004. **17**(4): p. 840-862.
45. Woese, C.R., *Interpreting the universal phylogenetic tree*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(15): p. 8392-8396.
46. Dubnau, D., *Growth medium-independent genetic competence mutants of Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 1990. **172**(7): p. 4048-4055.
47. Woo, P.C.Y., *et al.*, *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories*. Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(10): p. 908-934.
48. Manichanh, C., *et al.*, *A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(16): p. 5180-5188.
49. Rajendhran, J. and P. Gunasekaran, *Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond*. Microbiological Research, 2011. **166**(2): p. 99-110.
50. Tokajian, S.T., *Phylogenetic assessment of heterotrophic bacteria from a water distribution system using 16S rDNA sequencing*. Canadian Journal of Microbiology 2005. **51**(4): p. 325-35.
51. Gupta, R. and A. Mok, *Phylogenomics and signature proteins for the alpha Proteobacteria and its main groups*. BMC Microbiology, 2007. **7**(1): p. 106.
52. Inomata, A., *Identification of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water in Japan by DNA sequencing analysis*. Biocontrol Science 2009. **14**(4): p. 139-145.

53. Buonauro, R., *et al.*, *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002. **52**(6): p. 2081-7.
54. Van Aken, B., *et al.*, *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides*×*nigra* DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004. **54**(4): p. 1191-1196.
55. Jacobs-Wagner, C., *Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in Caulobacter*. *Molecular Microbiology*, 2004. **51**(1): p. 7-13.
56. Justesen, U.S., *et al.*, *Report of the First Human Case of Caulobacter sp. Infection*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007. **45**(4): p. 1366-1369.
57. Coenye, T., *et al.*, *Classification of Ralstonia pickettii-like isolates from the environment and clinical samples as Ralstonia insidiosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003. **53**(4): p. 1075-1080.
58. Ryan, M., J.T. Pembroke, and C. Adley, *Genotypic and phenotypic diversity of Ralstonia pickettii and Ralstonia insidiosa isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiology*, 2011. **11**(1): p. 194.
59. Maroye, P., *et al.*, *Investigation of an outbreak of Ralstonia pickettii in a paediatric hospital by RAPD*. *Journal of Hospital Infection*, 2000. **44**(4): p. 267-272.
60. Kulakov, L.A., *et al.*, *Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. **68**(4): p. 1548-1555.
61. Torbeck, L., *Burkholderia cepacia: This Decision Is Overdue*. *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 2011. **65**(5): p. 535-543.
62. Mahenthalingam, E., A. Baldwin, and C.G. Dowson, *Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology*. *J Appl Microbiol*, 2008. **104**(6): p. 1539-1551.
63. Williams, K.P., *et al.*, *Phylogeny of Gammaproteobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 2010. **192**(9): p. 2305-2314.
64. Corzo-Delgado, J.E., *Stenotrophomonas maltophilia, an increasingly important nosocomial pathogen*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2006. **24**(1): p. 1 - 3.
65. Hu, L.F., *et al.*, *Stenotrophomonas maltophilia resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class I integron*. *International journal of antimicrobial agents*, 2011. **37**(3): p. 230-234.

66. Wong, V., *et al.*, *Spread of Pseudomonas fluorescens Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(6): p. 2093-2096.
67. Hsueh, P.-R., *et al.*, *Outbreak of Pseudomonas fluorescens Bacteremia among Oncology Patients*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(10): p. 2914-2917.
68. Gershman, M.D., *et al.*, *Multistate Outbreak of Pseudomonas fluorescens Bloodstream Infection after Exposure to Contaminated Heparinized Saline Flush Prepared by a Compounding Pharmacy*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **47**(11): p. 1372-1379.
69. Allison, D.G., *The biofilm matrix*. Biofouling, 2003. **19**(2): p. 139 -150.
70. Klausen, M., *et al.*, *Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants*. Molecular Microbiology, 2003. **48**(6): p. 1511-1524.
71. Venugopalan, V.P., *et al.*, *Architecture of a Nascent Sphingomonas sp. Biofilm under Varied Hydrodynamic Conditions*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(5): p. 2677-2686.
72. Eller, G. and P. Frenzel, *Changes in Activity and Community Structure of Methane-Oxidizing Bacteria over the Growth Period of Rice*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(6): p. 2395-2403.
73. Ryan, M.P., J.T. Pembroke, and C.C. Adley, *Ralstonia pickettii in environmental biotechnology: potential and applications*. J Appl Microbiol, 2007. **103**(4): p. 754-764.
74. Sultan, M.Z., *et al.*, *Novel Oxidized Derivatives of Antifungal Pyrrolnitrin from the Bacterium Burkholderia cepacia K87*. J Antibiot, 2008. **61**(7): p. 420-425.
75. Kawakami, K., Y. Oda, and R. Takahashi, *Application of a Burkholderia cepacia lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropha oil*. Biotechnology for Biofuels, 2011. **4**(1): p. 42.
76. European Pharmacopoeia, *General monographs: Parenteral preparations*. 7 ed. 2011.
77. Prista, L.N., *Tecnologia Farmacêutica*. 4 ed. Vol. 3. 2011, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
78. Williams, K.L., *Microbial contamination control in parenteral manufacturing*. 1 ed. 2004, New York: Marcel Dekker.
79. FDA, *Guidance for industry: sterile drug products produced by aseptic processing – Current good manufacturing practice*. Food and Drug Administration, 2004.

- <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05d0047/05d-0047-bkg0001-Tab-09-GDL-vol2.pdf>. Consultado a 5 de Março de 2012.
80. European Pharmacopoeia, *General texts: Methods of preparation of sterile products*. 7 ed. 2011.
81. WHO, *Good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products*. World Health Organization, 2011.
http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex6.pdf. Consultado a 5 de Março de 2012.
82. EMA, *Manufacture of sterile medicinal products*. European Medicines Agency, 2012.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/q_and_a/q_and_a_detail_000027.jsp. Consultado a 5 de Março de 2012.
83. White, W., *Cleanroom technology: fundamentals of design, testing and operating*. 1 ed. 2001, United Kingdom: Wiley.
84. European Pharmacopoeia, *Chapter 5.1: General texts on sterility*. 7 ed. 2011.
85. USP, *Chapter <71> Sterility tests*. United States Pharmacopoeia, 2008.
86. European Pharmacopoeia, *Chapter 2.6.1: Sterility*. 7 ed. 2011.
87. EMA, *Recommendation on Sterility Testing*. European Medicines Agency, 2000.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2009/12/WC500017886.pdf. Consultado a 10 de Março de 2012.
88. Williams, K.L., *Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*. 2 ed. 2001, New York: Marcel Dekker Inc.
89. Andrade, S.S., *Comparative evaluation of pyrogens tests in pharmaceutical products*. International Journal of Pharmaceutics 2003. **265**(1): p. 115-124.
90. European Pharmacopoeia, *Chapter 2.6.8: Pyrogens*, 2011.
91. Pinto, T.J., *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 2003. **41**(2).
92. European Pharmacopoeia, *Chapter 2.6.14: Bacterial endotoxins*, 2011.
93. USP, *Chapter <85> Bacterial endotoxin test*. United States Pharmacopoeia, 2008.
94. Miller-Hjelle, M.A., *Polycystic Kidney Disease: An Unrecognized Emerging Infectious Disease?* Emerging Infectious Diseases, 2007. **3**(2): p. 113-127.
95. FDA, *Guidelines on validation of the limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices*. Food and Drug Administration, 1987.
<http://www.bcg-usa.com/regulatory/docs/1987/FDA198712A.pdf>. Consultado a 7 de Março de 2012.

96. Brito, L.A., *Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2011. **100**(1): p. 34-37.
97. Ryan, J. *Understanding and managing cell culture contamination*. 2008.
98. Drexler, H. and C. Uphoff, *Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention*. Cytotechnology, 2002. **39**(2): p. 75-90.
99. Robinson, L.B., *Contamination of human cell cultures by Pleuropneumonia-like organisms*. Science, 1956. **124**(32): p. 1147-1148.
100. Deutschmann, S.M., H. Kavermann, and Y. Knack, *Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia*. Biologicals, 2010. **38**(2): p. 238-248.
101. Rottem, S., *Beware of Mycoplasmas*. Trends in Biotechnology 1993. **11**(4): p. 143-150.
102. Luczak, J., *Trends in the incidence and distribution of mycoplasma contamination detected in cell lines and their products*. International Organization of mycoplasma, 1994. **3**: p. 77-78.
103. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2002. **38**(2): p. 79-85.
104. Lawrence, B., H. Bashiri, and H. Dehghani, *Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms*. Biologicals, 2010. **38**(2): p. 218-223.
105. Volokhov, D.V., et al., *Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques*. Molecular and Cellular Probes, 2011. **25**(2-3): p. 69-77.
106. EMA, *Guidance on testing for the detection of mycoplasma contamination*. European Medicines Agency, 2010.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004672.pdf. Consultado a 10 de Janeiro de 2012.
107. USP, *Chapter <63> Mycoplasma tests: a new regulation for mycoplasma testing*. United States Pharmacopoeia, 2010.
108. European Pharmacopoeia, *Chapter 2.6.7: Mycoplasmas*. 7 ed. 2011.
109. Pollack, J.D., M.V. Williams, and R.N. McElhaney, *The Comparative Metabolism of the Mollicutes (Mycoplasmas): The Utility for Taxonomic Classification and the Relationship of Putative Gene Annotation and Phylogeny to Enzymatic Function in the Smallest Free-Living Cells*. Critical Reviews in Microbiology, 1997. **23**(4): p. 269-354.

ANEXOS

ANEXO I

▪ **COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA (g/L)**

1. Agar de caseína e soja (CSA - Soyabean Casein Digest Agar)

Caseína pancreática	15.0
Peptona de soja	5.0
Cloreto de sódio	5.0
Agar	15.0
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

2. Caldo de caseína e soja (CSB - Soyabean Casein Digest Broth)

Caseína pancreática	17.0
Peptona de soja	3.0
Cloreto de sódio	5.0
Hidrogenofosfato dipotássio	2.5
Glucose	2.5
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

3. Agar de Sabouraud Dextrose (SDA - Sabouraud Dextrose agar)

Caseína pancreática	5.0
Peptona de carne	5.0
Dextrose	40.0
Agar	15.0
pH 5.6 ± 0.2 @ 25°C	

4. Agar de MacConkey (MCA - MacConkey agar)

Gelatina	17.0
Caseína pancreática	1.5
Peptona de carne	1.5
Lactose	10.0
Mistura de Sais Biliares	1.5
Cloreto de sódio	5.0
Vermelho neutro	0,03
Violeta de Cristal	0,001
Agar	13.5
pH 7.1 ± 0.2 @ 25°C	

5. Caldo de MacConkey (MCB - MacConkey Broth)

Caseína pancreática	20.0
Lactose	10.0
Oxibile	5.0
Púrpura de bromocresol	0.01
pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C	

6. R₂A (R₂ agar)

Gelatina	0.25
Peptona de carne	0.25
Hidrolisado ácido de caseína	0.5
Extrato de leveduras	0.5
Dextrose	0.5
Amido solúvel	0.5
Fosfato de dipotássio	0,3
Sulfato de magnésio	0,05
Piruvato de sódio	0,05
Agar	15
pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C	

7. Caldo de Tioglicolato (Broth)

Caseína pancreática	15.0
Extrato de levedura	5.0
Glucose D(+)	5.5
L-cistina	0.5
Cloreto de sódio	2.5
Tioglicolato de sódio	0.5
pH 7.1 ± 0.2 @ 25°C	

▪ COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

1. **Tampão TAE 50x:** 242 g/l Tris Base, 57,1 ml/L ácido acético, 100 ml/L de 0.5 EDTA, pH 8.
2. **Tampão TE:** 10 mM Tris·Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA
3. **Tampão de carga 10x:** 1% SDS, 50% de Glicerol e 0,05% de Azul de Bromofenol.

ANEXO II

1. O SISTEMA DE ÁGUA PURIFICADA

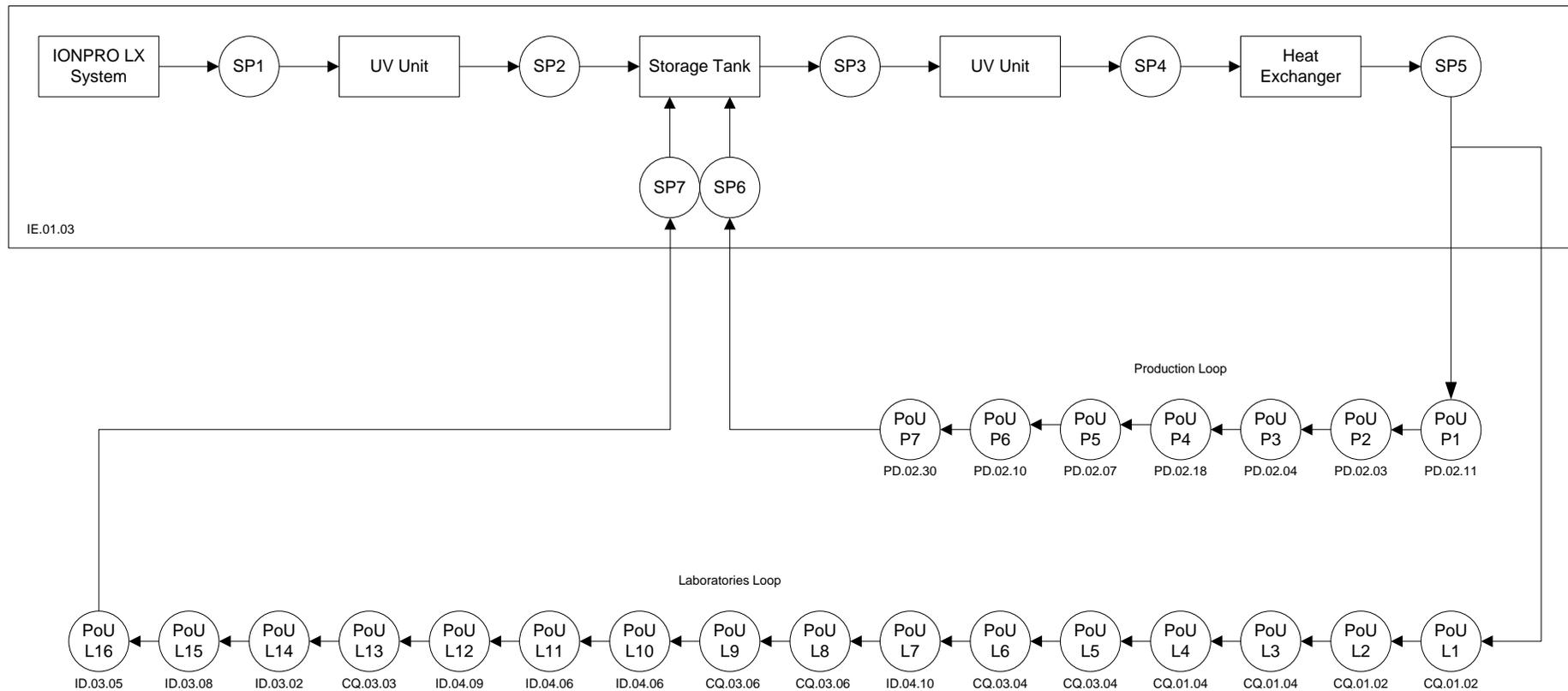


Figura 1. Diagrama do sistema de água purificada: principais constituintes e pontos de colheita. SP – Zona Técnica; PoU P – Ponto de colheita na produção; PoU – Ponto de colheita de laboratório (Bluepharma, 2011).

2. TESTES BIOQUÍMICOS E ESCOLHA DO SISTEMA API

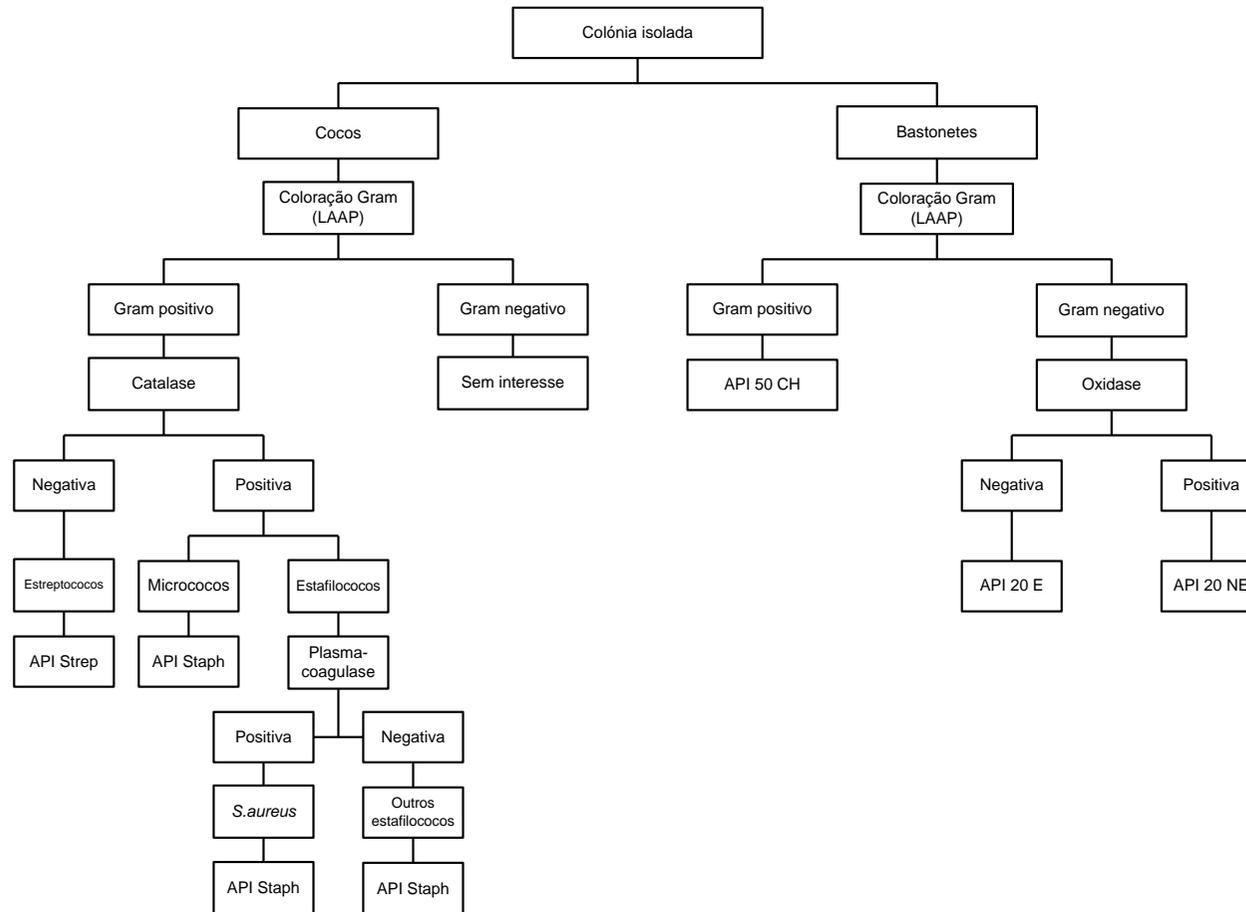


Figura 2. Esquema representativo da sequência de testes para diferenciação, caracterização e identificação de microrganismos (Bluepharma, 2011).

3. LIMITES PARA OS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA PURIFICADA

Tabela 1. Limites para os parâmetros a analisar na água purificada segundo as farmacopeias europeia e americana.

Critério	Limites	
	Farmacopeia europeia	USP
Aparência	Clara	Não se aplica
Condutividade	T=20°C – $\leq 4,3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ T=25°C – $\leq 5,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	T=15°C – $\leq 1,0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ T=20°C – $\leq 1,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Carbono orgânico total (TOC)	$\leq 0,5 \text{ mg/L}$	$\leq 0,5 \text{ mg/L}$
Nitratos	$\leq 0,2 \text{ ppm}$	Não se aplica
Metais pesados	$\leq 0,1 \text{ ppm}$	Não se aplica
Contaminação microbiana: Numero total de microrganismos viáveis	$\leq 100 \text{ CFU / mL}$	$\leq 100 \text{ CFU / mL}$

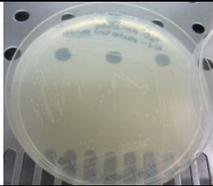
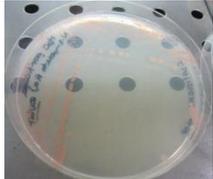
4. RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE MICROBIOLÓGICA QUANTITATIVA DA ÁGUA PURIFICADA

Tabela 2. Resultados em UFC para as análises microbiológicas efectuadas durante a qualificação de performance.

Dia Ponto de colheita		Fase 1										Fase 2										
		14-11-2011	15-11-2011	16-11-2011	17-11-2011	18-11-2011	21-11-2011	22-11-2011	23-11-2011	24-11-2011	25-11-2011	28-11-2011	29-11-2011	30-11-2011	05-12-2011	06-12-2011	07-12-2011	12-12-2011	13-12-2011	14-12-2011	15-12-2011	16-12-2011
SP1	IE.01.03	6		81		4		1		3		1		1		7		3		1		1
SP2		2	3	1	1	2	3	2	1	1	2	2	1	3	0	1	1	0	1	4	5	2
SP3		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0
SP4		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP6		0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	3	1	0	0	0	1	1	1
SP7		0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	3	0	0	0	2
PoU P1	PD.02.11	1			1		1			0			0			2				0		
PoU P2	PD.02.03		0			1		0			0			0				1			1	
PoU P3	PD.02.04			1			0			0		0			2			1			1	
PoU P4	PD.02.18	0			0		1			0			0			0			0			
PoU P5	PD.02.07		0			0		0			1			0			0				0	
PoU P6	PD.02.10			0		0			0			0			0			0			0	
PoU P7	PD.02.30	0			1		0			0			0			0			1			
PoU L1	CQ.01.02		0			0		0			0			0			0				0	
PoU L2	CQ.01.02			0			0		1			0			0			0			0	
PoU L3	CQ.01.04	2			19		5			1			1			2			5			
PoU L4	CQ.01.04		0			0		0			2			0			0				1	
PoU L5	CQ.03.04			0		0			0			0			0			0			0	
PoU L6	CQ.03.04	1			0		0			0			0			0			1			
PoU L7	ID.04.10		0			7		19						50				14			0	
PoU L8	CQ.03.06			0			0			12			17			6			0			
PoU L9	CQ.03.06	0			17		7			0			1			1			11			
PoU L10	ID.04.06		0			0		0			1			0			0			0		
PoU L11	ID.04.06			0		0			0			6			1			5			1	
PoU L12	ID.04.09	2			1		2				2			1		13			7			
PoU L13	CQ.03.03		0			0		0			0			8			12				13	
PoU L14	ID.03.02			4			15			6		1			3			26			24	
PoU L15	ID.03.08	0			4		4				1		1			4			7			
PoU L16	ID.03.05		26			14			25				1			1		9			4	

5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS COLÓNIAS ISOLADAS A PARTIR DA MEMBRANA EM R₂A

Tabela 3. Análise morfológica das colónias isoladas.

IDENTIFICAÇÃO	ANÁLISE MORFOLÓGICA	ASPETO
S1a)	Colónias circulares, muito pequenas e de cor esbranquiçada.	
S1b)	Colónias circulares de tamanho médio/grande, com aspeto mucóide e cor esbranquiçada.	
P1a)	Colónias circulares de tamanho médio, com aspeto mucóide e cor rosa vivo.	
P1b)	Colónias circulares de tamanho médio, com aspeto mucóide e cor amarelada.	
P4	Colónias circulares de tamanho pequeno, com aspecto mucóide e translúcidas.	
P7	Colónias circulares de tamanho médio, pulviniformes e de cor amarelo vivo.	
L8a)	Colónias circulares de tamanho médio, com aspeto brilhante e cor amarelo acastanhado.	
L8b)	Colónias circulares de tamanho médio, translúcidas e de cor branca.	

O papel da microbiologia no desenvolvimento farmacêutico

L12	Colónias circulares de tamanho pequeno, com aspeto baço e cor rosa velho.	
L14	Colónias circulares de tamanho médio, com aspeto mucóide pulviniforme e cor amarelada.	

6. RESULTADOS OBTIDOS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Tabela 4. Resultados obtidos para todos os ensaios bioquímicos realizados e Sistema de identificação daí resultante.

Ensaio	Amostras									
	S1 a)	S1 b)	P1 a)	P1 b)	P4	P7	L8 a)	L8 b)	L12	L 14
Exame microscópico	Cocobacilo	Cocobacilo	Cocobacilo	Cocobacilo	Bacilo	Bacilo	Cocobacilo	Cocobacilo	Bacilo	Cocobacilo
Coloração de Gram	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Positivo	Gram -	Gram -	Gram -
LAAP	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Gram -	Positivo	Negativo	Positivo
Oxidase	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa	Positiva
Catalase	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
Sistema Api	API 20NE	API 20NE	API 20E	API 20NE	API 20E	API 20E	API 20 NE	API 20 NE	API 20E	API 20 NE

7. IDENTIFICAÇÃO E TAXONOMIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Tabela 5. Isolados bacterianos identificados com sucesso e respetiva taxonomia.

Ponto	Bactéria	Filo	Classe	Ordem	Família	Género
S1b)	<i>Sphingomonas sp</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>
P1a)	<i>Methylobacterium populi</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>
P1b)	<i>Caulobacter sp</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i>
P4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomona</i>
P7	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>
L8a)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
L8b)	<i>Ralstonia picketti</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>
L14	<i>Bulkholderia cepacia</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Bulkholderia</i>

ANEXO III

1. QUANTIDADE E NÚMERO DE AMOSTRAS A TESTAR PARA O TESTE DE ESTERILIDADE

Tabela 1. Quantidade de amostra a testar consoante a quantidade desta por recipiente (European Pharmacopoeia 5.0, 2005).

Quantidade por recipiente	Quantidade máxima a utilizar em cada meio salvo exceção justificada e autorizada
<i>Líquidos</i> < 1 mL 1-40 mL >40 mL e <100 mL >100 mL <i>Líquidos antibióticos</i> <i>Outras preparações solúveis em água</i>	Conteúdo total do recipiente. Metade do conteúdo do recipiente. 20 mL 10% do conteúdo do recipiente. 1 mL Conteúdo total do recipiente.
<i>Sólidos</i> <50 mg ≥ 50 mg e <300 mg 300 mg a 5 g >5g	Conteúdo total do recipiente. Metade do conteúdo do recipiente. 150 mg 500 g

Tabela 2. Número mínimo de unidades a testar consoante o tamanho do lote (European Pharmacopoeia 5.0, 2005).

Número de unidades por lote	Número mínimo de unidades a examinar
<i>Preparações parentéricas</i> ≤ 100 > 100 e ≤ 500 > 500	10% e não menos de 4. 10 2% e não mais de 20.

ANEXO IV

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DO SANGUE DE *LIMULUS POLYPHEMUS*



Figura 1. a) *Limulus polyphemus*; b) Captura do animal; c) sangramento do animal para posterior extração do lisado.

ANEXO V

1. ANÁLISE SWOT PARA AS METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE *MYCOPLASMA SP.*

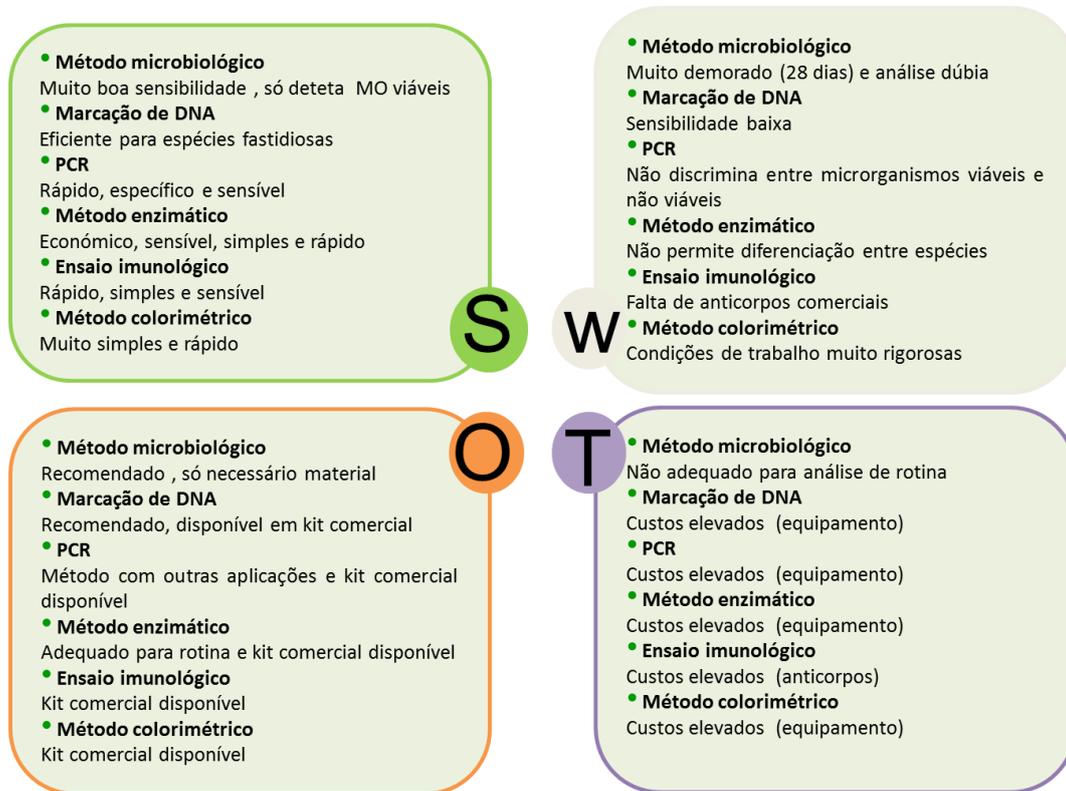


Figura 1. Análise SWOT para as metodologias disponíveis para deteção de *Mycoplasma spp.* em culturas celulares.

2. RESULTADOS OBTIDOS PARA O ENSAIO DE SENSIBILIDADE E PARA AS AMOSTRAS EM ESTUDO

Tabela 1. Valores obtidos para as leituras do teste do *mycoplasma spp.*, médias, razões e resultado final, para as amostras e controlos em estudo.

Amostra	Leitura	#1	#2	Média	Razão A/B	Resultado
CT26 (nova)	A	0,0818	0,0972	0,090	0,554	NEGATIVO
	B	0,0405	0,0587	0,050		
CT26 (em cultura)	A	0,0979	0,0986	0,098	0,519	NEGATIVO
	B	0,0475	0,0545	0,051		
A-549 (nova)	A	0,079	0,0874	0,083	0,525	NEGATIVO
	B	0,0405	0,0468	0,044		
A-549 (em cultura)	A	0,0797	0,0909	0,085	0,524	NEGATIVO
	B	0,0426	0,0468	0,045		
HT-29 (nova)	A	0,1587	0,1643	0,162	0,450	NEGATIVO
	B	0,0713	0,0741	0,073		
PC-3 (nova)	A	0,1517	0,1454	0,149	0,440	NEGATIVO
	B	0,0678	0,0629	0,065		
Meio DMEM	A	0,0825	0,079	0,081	0,536	NEGATIVO
	B	0,0447	0,0419	0,043		
Meio RPMI	A	0,1496	0,1398	0,145	0,430	NEGATIVO
	B	0,0636	0,0608	0,062		
CTRL Positivo	A	0,2307	-	0,231	33,247	POSITIVO
	B	7,6701	-	7,670		
CTRL Positivo – 1:2	A	0,3166	-	0,317	14,962	POSITIVO
	B	4,7371	-	4,737		
CTRL Positivo – 1:8	A	0,3956	-	0,396	3,612	POSITIVO
	B	1,4288	-	1,429		
CTRL Positivo – 1:4	A	0,3684	-	0,368	6,825	POSITIVO
	B	2,5143	-	2,514		
CTRL Positivo – 1:16	A	0,4131	-	0,413	1,756	POSITIVO
	B	0,7256	-	0,726		
CTRL Negativo	A	0,4313	-	0,431	0,152	NEGATIVO
	B	0,0657	-	0,066		

