



IPG Politécnico
|da|Guarda
Polytechnic
of Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Licenciatura em Farmácia

Relatório de Estágio Profissional I

Sílvia Filipa Loureiro Lopes

janeiro | 2016



Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL I

SÍLVIA FILIPA LOUREIRO LOPES
RELATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE LICENCIADO EM FARMÁCIA

janeiro | 2016



Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

CURSO DE FARMÁCIA – 1º CICLO
4º ANO / 1º SEMESTRE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO
PROFISSIONAL I
ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

SÍLVIA FILIPA LOUREIRO LOPES
SUPERVISORA: DR.^a JOANA MARIA LOUREIRO LOPES AMADO
ORIENTADOR: PROF. MAXIMIANO JOSÉ PRATA RIBEIRO

janeiro | 2016

AGRADECIMENTO:

Este foi mais um período de aprendizagem e enriquecimento da minha formação académica, revelando-se ainda mais promissor pela vivência de experiências num ambiente empresarial. Tive oportunidade de ver mais de perto, o dia-a-dia de uma indústria e perceber ainda melhor a importância de todo um trabalho conjunto. Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, quer pelo apoio e motivação, quer pelo conhecimento que me transmitiram.

A minha primeira referência vai para a minha supervisora Dr^a Joana Amado e para todos os analistas do Laboratório de Microbiologia, pelo apoio, científico e humano, dados desde o primeiro dia de estágio. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que depositaram em mim, por toda a disponibilidade como o facto de me terem acolhido como membro da sua equipa. Pelo constante incentivo e pela serenidade que sempre me transmitiram, um muito e reconhecido obrigada.

Agradeço também ao meu orientador Professor Maximiano Ribeiro por todo o apoio transmitido ao longo do estágio.

Expresso os meus agradecimentos à administração da Labesfal – Fresenius Kabi Portugal, pela oportunidade de ter realizado este estágio em ambiente industrial e a todos os colaboradores desta organização pois também eles contribuíram para que o decorrer deste estágio caminhasse no melhor sentido, transmitindo-me muitas vezes valores e palavras de sabedoria.

Por último e não menos importante agradeço à minha família pelo apoio, compreensão, espírito de entajuda e paciência que constantemente manifestaram ao longo do estágio. São sem dúvida, o meu maior orgulho.

A todos o meu sincero agradecimento.

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS:

EP – European Pharmacopeia

ESS – Escola Superior de Saúde

FP – Farmacopeia Portuguesa

GMPs – Good Manufacturing Practice

IPG – Instituto Politécnico da Guarda

LAL – Lisado de Amebócitos Limulus

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

TSA – Trypticase de Soja Agar

u.f.c – Unidade Formadora de Colónias

USP – United States Pharmacopeia

UV – Ultravioleta

WFI – Water for Injection

PENSAMENTO:

«A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e toda a arte.»

Albert Einstein

ÍNDICE:

INTRODUÇÃO	7
1. LABESFAL – FRESENIUS KABI PORTUGAL.....	8
2. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	10
2.1. MICROBIOLOGIA	10
2.2. REGRAS DE HIGIENE E SEGURANÇA	13
2.3. INSTALAÇÕES DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	14
2.4. REGRAS DE FUNCIONAMENTO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA.....	15
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	15
3.1. MONITORIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL:	15
3.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS:.....	16
3.3. ENSAIO DE BIOBURDEN:	17
3.4. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS: 18	
3.4.1. Endotoxinas Bacterianas	18
3.4.2. Ensaio de lisado de amebócitos de Limulus.....	18
3.4.3. Método cinético cromogénico	19
3.5. ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS NÃO ESTÉREIS	20
3.6. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	21
3.6.1. Repicagem e isolamento.....	21
3.6.2. Testes de diferenciação macroscópica e microscópica e morfológicos	22
3.6.3. Diferenciação Metabólica.....	23
CONCLUSÃO	25
BIBLIOGRAFIA	26

INTRODUÇÃO:

O presente relatório foi realizado no âmbito da unidade curricular de Estágio Profissional I pela aluna Sílvia Filipa Loureiro Lopes, a frequentar o 1º semestre do 4º ano do curso de Farmácia – 1º ciclo, da Escola Superior de Saúde (ESS) do Instituto Politécnico da Guarda (IPG).

O estágio foi realizado no ramo de Indústria Farmacêutica, na empresa Labesfal – Fresenius Kabi Portugal, localizada em Santiago de Besteiros, na unidade de controlo de qualidade, no laboratório de Microbiologia, entre os dias 1 de outubro de 2015 e 8 de janeiro de 2016, perfazendo um total de 500 horas. Teve ainda a orientação do docente da ESS-IPG Maximiano Ribeiro e a supervisão no local de estágio da Dr.ª Joana Amado.

Os objetivos gerais deste estágio foram o desenvolvimento de competências técnicas que permitam ao estudante a realização de atividades subjacentes à profissão de Técnico de Farmácia, no enquadramento das diversas áreas de integração profissional como:- a aplicação dos princípios éticos e deontológicos subjacentes à profissão;- a identificação, desenvolvimento e avaliação de planos de intervenção adequadamente integrados numa equipa multidisciplinar;- e dar resposta aos desafios profissionais com inovação, criatividade e flexibilidade. ¹

De forma a cumprir os objetivos gerais do estágio foi elaborado um plano individual de estágio, definindo as atividades a realizar no laboratório de microbiologia da empresa Labesfal. Como tal, de acordo com as tarefas desenvolvidas pelo laboratório de microbiologia, e sob a orientação do supervisor foi planeado a realização de:

- Preparação de meios de cultura e materiais necessários para ensaios a realizar;
- Monitorização microbiológica ambiental;
- Registo das atividades;
- Ensaio de *Bioburden*;
- Ensaio de qualidade microbiológica de água;
- Ensaio de qualidade microbiológica dos produtos não obrigatoriamente estéreis;
- Ensaio de quantificação de endotoxinas bacterianas;
- Repicagem, identificações e preservação de microrganismos;
- Esterilização e descontaminação de materiais e meios de cultura;
- Limpeza e gestão de resíduos do laboratório.

Por motivos de confidencialidade exigidos pela empresa, este relatório não contém anexos ou fotografias do laboratório de microbiologia e restantes instalações. Assim como a informação, que em alguns casos se encontra restringida pela mesma razão.

O relatório segue uma estrutura física baseada no Guia de Elaboração e Apresentação de Trabalhos Escritos da ESS-IPG ² e este baseia-se principalmente na reflexão individual da aprendizagem efetuada durante o período de estágio. Com este pretende-se avaliar a descrição e análise das atividades realizadas, tendo elas sido ou não planeadas, bem como a apresentação de sugestões pertinentes.

1. LABESFAL – FRESENIUS KABI PORTUGAL

A Labesfal teve a sua génese no laboratório de uma farmácia fundada em Campo de Besteiros no início da década de 50 pelo farmacêutico Dr. João Almiro, fundador e dirigente de uma importante obra social sediada na região de Campo de Besteiros.³

Durante toda a década de 80, a Labesfal direcionou-se estrategicamente para o mercado externo, tirando partido da sua ampla gama de produção e da sua capacidade competitiva junto de grandes centrais de compra no estrangeiro, tendo conquistado importantes posições de mercado em vários países e a ocupar um lugar destacado no panorama das exportações portuguesas de produtos farmacêuticos.

Adquirida a projeção internacional, a Labesfal colocou o crescimento no mercado interno na primeira linha das suas opções estratégicas enquanto optava pela internacionalização como forma de consolidar o seu posicionamento alcançado no mercado externo.

Apostando forte numa estratégia de crescimento, a Labesfal deu início a importantes projetos de investimento em Portugal e no estrangeiro, visando a inovação e a modernização tecnológica da sua infraestrutura industrial, a introdução de novos produtos, bem como a criação e aquisição de participações sociais em novas empresas no estrangeiro.

No âmbito destes investimentos, a Labesfal iniciou a construção em Santiago de Besteiros de um novo complexo industrial, situada na Zona Industrial de Lagedo, no concelho de Tondela e distrito de Viseu.

No início de 2005, a Empresa deu um passo determinante no seu processo de desenvolvimento, ao ser adquirida pela multinacional alemã Fresenius Kabi, subsidiária do Grupo Fresenius SE. O novo acionista instalou no complexo industrial da Labesfal um centro de competências para o desenvolvimento e produção de soluções injetáveis e iniciou um novo ciclo de investimentos locais. Em Julho de 2013, a Labesfal alienou a marca Labesfal Genéricos a qual se veio a constituir como uma nova entidade legal. No essencial, esta operação traduziu-se na alienação das Autorizações de Introdução no Mercado que a Labesfal comercializava no mercado ambulatorio e na transferência dos colaboradores afetos a esta unidade de negócio para a nova empresa.

Como missão a Labesfal – Fresenius Kabi realiza sistematicamente um enorme esforço de valorização em recursos humanos, orientados pela inovação, sentido de mudança e destacada atenção ao cliente, assumindo como missão “Baseados na nossa competência em terapia de infusão e nutrição clínica com os nossos produtos farmacêuticos e dispositivos médicos e com o comprometimento e dedicação dos nossos colaboradores, iremos gerar os recursos necessários que nos permitam ser líderes globais na terapia e tratamento de doentes críticos e crónicos, tanto em ambiente hospitalar como fora dele”. Como valores enquadram-se o foco no cliente, qualidade, integridade, colaboração, criatividade, paixão e compromisso. No que diz respeito à sua visão e tendo como base a sua experiência e compromisso na área dos medicamentos e tecnologias essenciais à vida, em 2020 espera ter construído

uma empresa de 10 mil milhões de euros, reconhecida pela sua verdadeira dedicação às pessoas que cuidam de doentes crónicos e críticos.

2. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

2.1.MICROBIOLOGIA

A microbiologia é a ciência que estuda os organismos de dimensões microscópicas incluindo eucariontes unicelulares e procariontes, como as bactérias e fungos e outros organismos que possuem durante a sua evolução alguma forma microscópica, como são ovos ou formas larvares. Sendo que os microrganismos são organismos microscópicos, dotados de individualidade, com organização biológica simples, capazes de executar os processos vitais e multiplicar-se independentemente de outras células ou organismos.⁴

A microbiologia farmacêutica é um ramo aplicado da microbiologia, ligado à indústria farmacêutica, responsável por assegurar a segurança do paciente e a qualidade do produto, desde o controlo de qualidade, desenvolvimento de produtos e métodos, produção e estabilidade.⁵

Uma área fundamental da microbiologia farmacêutica é o controlo de qualidade, pelo estudo dos microrganismos contaminantes, associados à produção de produtos farmacêuticos, uma vez que, a contaminação microbiológica torna-se um grave problema quando resulta em efeitos indesejáveis devido à utilização desses produtos. Esta preocupação diz respeito tanto a produtos farmacêuticos estéreis como não estéreis, e por isso, a microbiologia farmacêutica está envolvida: na compreensão da probabilidade do aumento de contaminações no produto e da severidade dos seus efeitos; no desenvolvimento de métodos de deteção de contaminações; sendo para isso, necessário perceber o tipo de produto, o seu objetivo e a natureza e número de contaminantes, procurando assim formas de minimizar essas contaminações.⁶

A microbiologia farmacêutica, foca-se também na monitorização do ambiente em que o produto é fabricado através da recolha de dados que indicam se as salas limpas estão a laborar corretamente, se a limpeza efetuada é eficiente e se os operadores estão a executar as suas atividades, de forma correta.⁶

As *Good Manufacturing Practice* (GMPs) contribuem para a garantia de qualidade que asseguram que os produtos são produzidos e controlados com padrões de referência adequados na área da produção do controlo de qualidade. O controlo de qualidade trata da amostragem, especificações e ensaios. Trata também da organização, documentação e procedimentos que asseguram que nenhum dos materiais utilizados na produção e que nenhum dos medicamentos aprovados para venda ou distribuição serão dispensados, até que a sua qualidade seja satisfatória.⁷

No laboratório de microbiologia existem vários procedimentos, instruções técnicas e protocolos como também as suas metodologias aplicadas de acordo com a legislação, nomeadamente, as Farmacopeias de referências, *European Pharmacopoeia* (EP), da qual a Farmacopeia Portuguesa (FP) é baseada, e *United States Pharmacopoeia* (USP), que fornecem uma base legal e científica para o controlo de qualidade de medicamentos durante o processo de desenvolvimento e produção,

estabelecendo a composição qualitativa e quantitativa e os ensaios a efetuar sobre os medicamentos, matérias-primas utilizadas na produção e intermediários da síntese.

As monografias da EP e da FP, obrigam a que a presença de microrganismos seja limitada para todas as preparações, sendo que em algumas delas é obrigatório que esta seja mesmo nula, para assim o produto estar conforme, e estar em condições de ser comercializado. E como tal de extrema importância o controle microbiológico de todo o processo de produção, das matérias-primas utilizadas, do meio envolvente, dos analistas, para que haja garantias de que o produto apresente os parâmetros de qualidade desejada. É, portanto, necessário garantir que quando um produto é colocado no mercado se encontra microbiologicamente conforme, tendo em conta os parâmetros microbiológicos de cada um.

Na indústria farmacêutica, os microrganismos com maior relevância são as bactérias e fungos.

Bactérias: são células procarióticas unicelulares com estrutura e morfologia específica, não apresentando membrana nuclear, mitocôndria, e complexo de Golgi ou retículo endoplasmático, e reproduzem-se assexuadamente ⁸. As bactérias podem apresentar vários tipos morfológicos, sendo os mais vulgares os cocos (forma esférica), os bacilos (forma de bastonete), os espirilos (forma espiralada) e os vibriões (forma de vírgula). Os cocos são redondos, mas podem ser ovais, alongados ou achatados numa das extremidades. Quando os cocos se dividem, as células podem permanecer unidas umas às outras, surgindo em decorrência cocos aos pares (diplococos), cadeias (estreptococos) e cachos (estafilococos). A morfologia das bactérias é uma característica genética e geralmente as bactérias são monomórficas, isto é, mantêm uma única forma. No entanto, certas condições de cultivo e ambientais podem fazer com que estes microrganismos apresentem formas ou arranjos diferentes. Alguns microrganismos são pleomorfos. ⁹

Fungos: são organismos eucariotas que contêm um núcleo bem definido e outros organelos como mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Os fungos podem existir na forma unicelular (leveduras) que se replicam assexuadamente ou na forma filamentosa (fungos filamentosos) que se podem replicar sexuada e assexuadamente. ⁸

Meios de cultura: os microrganismos tal como outros organismos necessitam de obter os nutrientes apropriados do seu meio ambiente. Assim se queremos cultivar e manter microrganismos vivos no laboratório, necessitamos de meios de cultura que, contém nutrientes apropriados para o seu crescimento. Para além de nutrientes é igualmente necessário que as condições de oxigénio (presença ou ausência), pH e pressão osmótica sejam adequadas ao crescimento desses microrganismos. Na preparação dos meios e na manutenção das culturas de microrganismos é importante observar as necessárias condições de assepsia, de modo a se evitarem contaminações com outros microrganismos. Os meios de cultura definem-se como conjunto de nutrientes, fatores de crescimento e outros componentes que possuem as condições necessárias para o desenvolvimento dos microrganismos. Dada a variedade de meios de cultura, é fácil compreender que não há um meio de cultura universal. Muitas vezes, o que é necessário para o crescimento de uma determinada bactéria inibe totalmente o crescimento de outras; é o que sucede com a matéria orgânica necessária ao crescimento de bactérias

heterotróficas que, na maioria das vezes, inibe totalmente o crescimento de bactérias autotróficas ⁹. Permitem assim o crescimento, isolamento, identificação e manutenção de microrganismos no laboratório como também verificar suscetibilidades a antibióticos e outros compostos químicos. Os meios de cultura dividem-se primeiramente em meios sólidos, aqueles que contêm agar, e meios líquidos, sem agar. Os meios sólidos permitem a individualização das colónias por outro lado, os meios líquidos permitem melhor difusão de metabolitos, mas não o isolamento de colónias. ⁴

Esterilização e Desinfecção: dadas as condições a que o produto está sujeito durante o seu fabrico e durante o seu circuito dentro do laboratório de Microbiologia, a esterilização e desinfecção são dois conceitos com máxima relevância. A esterilização compreende a destruição ou remoção completa de todas as formas de vida, sendo patogénicas ou não patogénicas, sendo que a desinfecção apenas consiste na remoção de parte ou da totalidade de microrganismos, patogénicos ou não, de um objeto ou superfície.

Os processos de desinfecção são categorizados em processos de alto nível, nível intermédio e baixo nível. A desinfecção de alto nível pode, de forma geral, aproximar-se da esterilização em eficiência, entretanto os esporos podem sobreviver na desinfecção de nível intermédio e alguns microrganismos podem permanecer viáveis quando expostos à desinfecção de baixo nível. A eficiência desses processos é influenciada pela natureza do produto a ser desinfetado, número e resistência dos organismos contaminantes, natureza do artigo a ser desinfetado, número e resistência dos organismos contaminantes, quantidade de material orgânico presente (que pode inativar o desinfetante), tipo e concentração do desinfetante, além da duração e temperatura da exposição. Os desinfetantes de alto nível, como o peróxido de hidrogénio, são utilizados para artigos envolvidos com procedimentos invasivos que não suportam os procedimentos de esterilização. Os desinfetantes de nível intermediário, como os álcoois, são utilizados para a limpeza de superfícies ou de instrumentos nos quais é improvável a contaminação com esporos bacterianos ou por outros organismos altamente resistentes. Os desinfetantes de baixo nível, como os compostos de amónio quaternário, são utilizados para tratar dispositivos não críticos. Os desinfetantes que exterminam as bactérias, são chamados de bactericidas e os que inibem o seu crescimento, sem inviabilizar a bactéria, chamam-se bacteriostáticos ⁸

Os meios de esterilização podem ser físicos ou químicos. Na Labesfal, como meio de esterilização físico utiliza-se o calor húmido, recorrendo a autoclaves em que através do seu vapor sob pressão procede de forma muito eficiente à esterilização devido às altas temperaturas que causam a desnaturação das proteínas microbianas. A taxa de morte bacteriana durante o processo de autoclavagem é alta, mas é influenciada pela temperatura e pela duração do ciclo, pela taxa de fluxo do vapor, densidade e tamanho da carga e pela colocação da carga na câmara. Deve evitar-se a formação de bolsas de ar que inibem a penetração do vapor na carga ⁸. Os materiais e meios contaminados que têm origem em ensaios de validação onde se utilizam estirpes, ensaios de esterilidade positivos, contagem em placa, identificações, doseamentos microbiológicos, placas de monitorização ambiental,

as agulhas resultantes dos ensaios de esterilidade e de outros ensaios ou procedimentos que resultem em desenvolvimento microbiano com a contaminação de meios e materiais. Recorre-se também ao calor seco onde os microrganismos morrem por oxidação, processo realizado em estufas e a temperaturas mais elevadas (250°C durante 30 minutos), para despirogenar frascos de vidro, nomeadamente os que são utilizados no ensaio de quantificação de endotoxinas bacterianas, e ainda as radiações não-ionizantes, compreendendo estas as radiações ultravioleta (UV), utilizadas nomeadamente na esterilização de material necessário para a realização de ensaios de esterilidade. As radiações não-ionizantes têm comprimento de onda longo e a mais utilizada é a luz ultravioleta. A luz ultravioleta provoca a formação de ligações químicas entre as timinas adjacentes e estes dímeros alteram a replicação do DNA (ácido desoxirribonucleico) no momento da reprodução. As lâmpadas germicidas são usadas para o controlo dos microrganismos do ar ⁹.

Como meios químicos de esterilização utiliza-se principalmente álcoois, nomeadamente etanol a 70% que é mais ativo do que o álcool a 95%, uma vez que este apresenta maior eficácia tanto antisséptica como desinfetante, pela sua alta solubilidade tanto em água como em lípidos. Na ausência de água, as proteínas não são desnaturadas tão rapidamente quanto na sua presença e isto explica porque o álcool etílico absoluto é menos ativo do que as misturas de álcool e água. A atividade germicida dos álcoois é intensificada com o aumento do comprimento da cadeia (máximo de 5 a 8 carbonos) ⁹. Utilizam-se também derivados halogéneos, como o hipoclorito de sódio, utilizado principalmente como desinfetante, e peróxido de hidrogénio, um antisséptico de largo espectro em concentrações que o permitem ter também ação esporicida, e tem ainda aplicação na sua forma gasosa em esterilização de material a usar em ensaios de esterilidade, principalmente quando estes são realizados no isolador.

2.2. REGRAS DE HIGIENE E SEGURANÇA

O acesso ao laboratório de microbiologia é restrito, sendo a entrada reservada aos analistas que trabalham no mesmo e a visitas esporádicas, nomeadamente auditorias. Assim sendo é necessário o uso de equipamento pessoal (vestuário) adequado, que engloba uma touca, um fato-macaco e calçado de cor branca. No caso das auditorias, mesmo que os auditores estejam equipados com um fato descartável, ao entrar no laboratório de microbiologia é necessário colocar outro por cima do já usado, e mais um par de proteção de calçado. Para isso existe uma antecâmara à entrada do laboratório com cacifos para guardar o vestuário. Dentro do laboratório de microbiologia, deve ser sempre que possível, evitado o contacto direto com as amostras e outros produtos, bem como os meios de cultura, usando-se para o efeito barreira primário luvas e máscara.

A limpeza das salas do laboratório de microbiologia deve ser realizada de modo a eliminar/diminuir a contaminação microbiana para níveis aceitáveis.

A limpeza/desinfecção das superfícies devem ser sempre efetuadas de cima para baixo, nunca voltando a passar no mesmo local no sentido inverso (de baixo para cima).

A limpeza/desinfecção das superfícies (chão e teto) deve ser iniciada na zona oposta da entrada da sala, e sempre da classe mais alta para a classe mais baixa (por exemplo: de classe B para a classe C). A limpeza/desinfecção destas superfícies deve ser sempre efetuada no mesmo sentido, evitando assim o arrastamento de resíduos.

De modo a evitar o desenvolvimento de espécies resistentes a um determinado detergente/desinfetante, é praticada uma rotação mensal de dois detergentes/desinfetantes tornando-se efetiva no primeiro dia útil de cada mês.

2.3.INSTALAÇÕES DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

O laboratório de microbiologia encontra-se localizado dentro do laboratório de controlo de qualidade, em espaço adjacente ao laboratório de controlo físico-químico, devidamente isolado dos restantes espaços. No laboratório é seguido um circuito de “marcha em frente”, que se efetua das salas mais limpas para as salas mais sujas. Seguindo este circuito, encontramos quatro salas esterilizadas, três delas com câmara de fluxo laminar e outra com isolador. Seguindo em frente, encontramos uma sala de preparação de amostras, e um corredor de acesso ao armazém do laboratório, à sala de ensaios de qualidade de produtos não estéreis e de qualidade microbiológica de águas, à sala de pesquisa de endotoxinas bacterianas e à sala de pesagem. Continuando o percurso, existe uma sala de estufas, para a incubação de meios e leitura dos seus resultados, e seguidamente a sala de identificação de microrganismos. Este circuito termina na sala de lavagem considerada como a sala mais suja do laboratório.

2.4.REGRAS DE FUNCIONAMENTO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

O registo de tudo o que é realizado é muito importante na industria farmacêutica dada a responsabilidade das operações que são realizadas.

Por esta razão existem os “Logbook” que são cadernos de laboratório nos quais são descritos todos os ensaios efetuados, bem como os resultados obtidos, tendo estes de ser assinados e datados pelos analistas/operadores.

Para ensaios e operações específicos, como são exemplo os ensaios de esterilidade e *Bioburden*, e ações como a abertura de porta de estufas e frigoríficos, a receção de amostras no laboratório, entre outras. Os equipamentos têm um caderno associado onde se descreve a atividade realizada, data e assinatura do analista.

Os lotes dos produtos e materiais utilizados, bem como o seu prazo de validade deve ser também sempre tido em conta, e registado nos locais destinados para tal. Os meios de cultura requerem uma atenção especial no que respeita ao prazo de validade, uma vez que quando este é ultrapassado o crescimento microbiológico pode estar comprometido.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

3.1. MONITORIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL:

O controlo microbiológico é dos processos primordiais e mais importantes a realizar sendo que, o ar é definitivamente o meio onde ocorre maior dispersão dos microrganismos, desta forma pode ocorrer facilmente a contaminação entre salas. Quando os microrganismos se encontram no ar facilmente as superfícies, e os produtos que se encontram a ser fabricados. Sendo o analista a maior fonte de contaminação num ensaio é importante monitorizar as barreiras que existem entre o analista e o produto, isto é, o fato e as luvas. Com esta monitorização é possível avaliar se o fardamento foi realizado de forma correta. Entre os vários tipos de salas existem evidentemente barreiras e medidas para diminuir a contaminação entre estas, começando pela troca de fardamento dos operadores, passando pelo uso de antissépticos, pelo sistema diferencial de pressão entre estas, pelas exigências específicas do fardamento e comportamento a adotar em certas áreas restritas, entre outras, que faz com que tudo remonte para uma diminuição do risco de contaminação cruzada.

A frequência da amostragem depende do grau de assepsia/desinfecção exigido para o local, consoante as operações que ocorrem na mesma. Sendo que há salas que são verificadas diariamente, sempre que se encontram em produção, há outras que são verificadas semanalmente, mensalmente ou trimestralmente, isto nos diversos pontos previstos já estipulados.

Todas as unidades de produção são submetidas ao controlo ambiental e desta forma, de um modo geral, são efetuadas amostragens de ar sedimentado, de ar centrifugado, de contacto de superfícies através de placas próprias ou zaragatoas. Ao operador, sempre que aplicável é efetuada uma amostragem ao fato (em zonas críticas como luvas, capuz, cotovelos, nádegas, joelhos e sapatos). Da mesma forma são de igual forma realizadas amostragens às superfícies consideradas mais críticas.

As amostras de ar sedimentado e centrifugado são realizadas em meio de *Trypticase de soja agar* (TSA), para pesquisa de bactérias, e de *Sabouraud Dextrose agar* (SDA) para pesquisa de fungos (leveduras ou pluricelular). As amostras de ar sedimentado estão expostas num período máximo de 4 horas. O meio TSA é um meio de cultura não seletivo onde crescem diferentes bactérias. O meio é rico em triptona e peptonas, fonte de hidratos de carbono, proteínas e lípidos para o desenvolvimento dos microrganismos verificados. O meio SDA é um tipo de ágar que contém peptonas. É utilizado para cultivo de dermatófitos e outros tipos de fungo podendo ser usado também para bactérias filamentosas. O pH do ágar é de 5,6 que permite a inibição do crescimento bacteriano e tendo uma concentração mais neutra vê-se reduzida a concentração de dextrose para que seja possível o crescimento de mais fungos.

No que diz respeito à monitorização de superfícies por contacto esta pode ser realizada com zaragatoas, que são inoculadas depois em meio de TSA. Nas zonas de produção de antibióticos, as placas com meio de crescimento preferencialmente bacteriano têm adicionado no próprio meio um

inibidor do efeito antibiótico, o β -lactamase que inibe os antibióticos da família das β -lactaminas (penicilinas, cefalosporinas I, II, III, monobactames, carbapenemas).

Todos os dias é rececionado no laboratório de microbiologia placas que se encontram separadas por unidade, dia e turnos respetivos, e por tipo de meio em sacos estéreis. Estas encontram-se devidamente identificadas com o lote de produção, a data e o operador, e em casos aplicáveis, o horário de exposição ao ar, o número do ponto de amostragem quando se trata de fatos, a identificação da mão, e o código do ponto de amostragem da sala.

Os resultados são obtidos após a incubação previamente determinada. Estes resultados obtidos resultam da contagem de u.f.c (unidade formadora de colónia) visíveis e registam-se no impresso próprio que vem sempre acompanhado das placas. Quando se observa a contaminação e a quantidade de u.f.c é superior ao nível de alerta ou ação estipulado, é necessário efetuar identificação de microrganismos, aplicando-se também para salas estéreis.

Durante o processo de incubação e da leitura dos resultados é importante ter em atenção ao prazo de validade das placas, uma vez que é durante este período de tempo que se garante que o meio de cultura se encontra em condições físicas, químicas e bioquímicas ideais para promover o crescimento microbiológico.

3.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS:

A água é um meio de fácil contaminação para microrganismos com necessidades nutritivas pouco exigentes. Assim sendo, é do interesse de toda a indústria farmacêutica que toda a água utilizada no fabrico de produtos e ensaios seja previamente tratada.

O controlo de qualidade da água é fundamental visto que para além de ser utilizada no processo de produção de medicamentos é utilizada também em lavagem de equipamentos, instalações críticas e em ensaios de controlo físico-químico e microbiológico.

Devido à importância da qualidade a água na produção de medicamentos na Labesfal eram utilizadas dois tipos de águas, a água purificada e a água WFI (Water for Injection) sendo esta descrita como água para preparações de injetáveis.

As amostras de água eram colhidas em diversos pontos do circuito de tratamento de águas, em frascos de vidro esterilizados e despirogenados (uma vez que as águas WFI sofrem também um ensaio de quantificação de endotoxinas), sendo esta colheita realizada com uma frequência previamente estabelecida, podendo ser diária, semanal e bi-semanal dependendo do local de colheita.

Após a sua colheita era-lhes atribuído um número interno sendo depois separadas tendo em conta o tipo de água e a quantidade a filtrar. Estas eram então filtradas com recurso a funis adaptados às placas com o meio e uma bomba de vácuo, em que a membrana filtrante incorporada no funil é aplicada numa cassette com um meio apropriado para contagem de microrganismos (meio R2A). O meio R2A foi desenvolvido para estudar as bactérias que normalmente estão presentes em água potável e estas bactérias tendem a ser espécies de crescimento lento e rapidamente seria suprimida por

espécies de crescimento mais rápido num meio de cultura mais rico. No final do ensaio as cassetes vão a incubar a temperatura favorável estipulada entre os 30-35°C num período mínimo de cinco dias.

Este ensaio é realizado em condições de assepsia, utilizando-se para garantir tal condição, peróxido de hidrogénio, álcool a 70%, bico de *Bunsen* pois visa a diminuição de microrganismos no campo de trabalho através do calor e barreiras físicas primárias por parte do analista, como luvas estéreis e máscara.

Terminado o seu período de incubação estabelecido, são então observados os resultados depois de se proceder à contagem de u.f.c total, sendo que se não se observar crescimento microbiano o resultado é inferior a um (<1), e a amostra está conforme.

Sempre que fosse observado crescimento microbiano, procedia-se obrigatoriamente à identificação de microrganismos, de modo a identificar-se se eram ou não microrganismos que poderiam colocar em causa a qualidade do produto.

3.3. ENSAIO DE BIOBURDEN:

O ensaio de *Bioburden* é o mais comum na análise microbiológica realizado na indústria farmacêutica. É realizado não só em matérias-primas e produtos acabados fabricados, mas também em várias fases durante o processo de fabrico – por exemplo, imediatamente antes da esterilização por calor húmido ou filtração esterilizante, a fim de confirmar que a carga microbiana existente se encontra dentro da capacidade do processo de esterilização em questão. Este método tem como principal vantagem ser adaptado para medir a carga microbiana em materiais oleosos utilizando solventes não aquosos e como desvantagem ser um método relativamente mais lento e dispendioso.¹⁰

Durante o ensaio procede-se à filtração de uma quantidade definida no procedimento técnico da amostra através de uma bomba de vácuo, em condições de assepsia. A cada conjunto de ensaios há também a realização de um ensaio branco, com fluido de lavagem. As amostras relativas a cada produto são incubadas em cassetes com os funis que permitem a incorporação da membrana de filtração diretamente no meio TSA. Em alguns produtos previamente definidos a incubação é realizada também em anaerobiose, selando-se a placa a incubar num invólucro com um absorvente de oxigénio. A sua incubação é feita durante três dias na estufa de 20-25°C e três dias na estufa de 30-35°C sendo o resultado obtido após 6 dias de incubação repartidos nas diferentes incubadoras, sempre que existia crescimento microbiano era necessário identificar os microrganismos.

O ensaio de *Bioburden* compreende a contagem de microrganismos viáveis totais. As amostras devem também ser sujeitas ao ensaio de quantificação de endotoxinas apenas quando se trate de amostras de validação do processo de produção.

3.4. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS:

3.4.1. Endotoxinas Bacterianas

O mecanismo de toxicidade que as endotoxinas desencadeiam é causado pela fração lipídica dos lipopolissacáridos. Por exemplo, ao dar-se a lise das bactérias dentro de um organismo, a resposta face aos lípidos que passam à corrente sanguínea pode dar-se através da ativação do sistema de complemento. Esta fração lipídica origina a libertação de diferentes citocinas como as interleucinas 1 e 8, ativando-se também o fator de necrose tumoral. A infeção desencadeada está associada a processos inflamatórios e pode representar grande perigo para o organismo infetado. As interleucinas 1 são uma série de citocinas que o organismo liberta como resposta imune e face à inflamação. Este sinal promove a migração de neutrófilos ao local onde ocorreu a infeção, desencadeando-se a quimiotaxia. Isto facilita a ocorrência da fagocitose, no entanto em alguns casos, dependendo do estado do sistema imunitário do indivíduo e do grau da infeção, as bactérias podem chegar a provocar uma sépsis generalizada, com todos os riscos que isto representa. Conhecem-se muitos casos em que as bactérias *Gram-negativas* causaram a morte por infeção sistémica em mamíferos superiores.⁹

Entre as bactérias *Gram-negativas* encontram-se algumas mais conhecidas como a *Salmonella* e a *Escherichia coli* e outras do género da *Neisseria*.

3.4.2. Ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus*

O caranguejo *Limulus polyphemus* é um dos animais mais antigo na terra, as suas origens datam de há mais de 200 milhões de anos. Este animal tão resistente é capaz de sofrer coagulação da sua hemolinfa devido à presença de endotoxinas bacterianas. Ao descobrir-se este acontecimento na década de 60, continuaram-se as investigações até ser possível aproveitar esta reação para realizar ensaios *in vitro* de deteção de endotoxinas em diferentes meios. O *Limulus polyphemus* pertence ao grupo dos caranguejos ferradura. Este caranguejo habita na costa atlântica, desde a parte mais a norte do continente americano até ao golfo do México.¹¹

Os responsáveis pela coagulação da hemolinfa dos caranguejos *Limulus polyphemus* são os amebócitos, os principais componentes da hemolinfa deste animal. Os amebócitos cumprem nos invertebrados um papel semelhante ao dos glóbulos brancos dos vertebrados, defendendo o organismo de agentes patogénicos e libertando uma série de enzimas como resposta a endotoxinas provenientes das bactérias. Os investigadores estudaram este fenómeno até conseguirem comprovar que ao diluir um lisado dos amebócitos extraídos do caranguejo ferradura em meio aquoso, podiam ser detetadas quantidades muito pequenas de endotoxinas.¹¹

Os amebócitos contêm enzimas pró-coagulantes que desencadeiam uma cascata de reações. O produto final destas reações em cadeia é um gel composto por proteínas coaguladas. A resposta enzimática é produzida ao contato dos amebócitos com as endotoxinas.¹¹

O ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) só é válido para a detecção de endotoxinas e não de qualquer outro pirogênio. Apesar das endotoxinas bacterianas serem dos pirogênios que mais prevalecem após aplicação de medidas de sanitização comuns nas indústrias, por serem muito resistentes ao calor e aos diferentes reagentes químicos utilizados na esterilização, um ensaio LAL negativo apenas indica a ausência de endotoxinas, não a de outros pirogênios. A realização deste ensaio apenas conduz à confirmação de que o meio se encontra livre de pirogênios quando é acompanhado de outras análises e medidas sanitárias específicas para erradicar o resto dos microrganismos contaminantes. ¹¹

O ensaio de LAL pode ser realizado utilizando diferentes métodos para avaliar o processo de gelificação que ocorre como resposta dos amebócitos às endotoxinas. Estas técnicas são chamadas de Gel-Clot, turbidimetria e métodos cromogénicos. ¹¹

Na Labesfal, o ensaio era efetuado segundo o método cinético cromogénico como referido na FP.

3.4.3. Método cinético cromogénico

O método de detecção de endotoxinas bacterianas que utiliza o LAL foi desenvolvido na década de 60, desde esse momento, tem-se vindo a confirmar uma ferramenta muito útil na investigação e na indústria. Já desde princípios do século conhecia-se que a hemolinfa do caranguejo *Limulus Polyphemus* sofria um processo de coagulação. Mais tarde descobriu-se que a coagulação da hemolinfa era causada por bactérias *Gram-negativas* que provocam o desencadear de uma série de reações enzimáticas em cascata. Estas reações enzimáticas ocorrem nos amebócitos, devido à presença de endotoxinas que constituem a parede celular das bactérias *Gram-negativas* e originam, como resultado, a formação de coagulina, proteína causadora do processo de coagulação. ¹¹

Posteriormente, as investigações sobre a cascata de reações enzimáticas que se produz nos amebócitos de *Limulus* concluíram que estas reações são capazes de cisar ligações de péptidos que se encontram unidos a moléculas de p-nitroanilina. Ao libertar-se a p-nitroanilina, que é um corante amarelo, altera-se a tonalidade da solução. Adicionando um péptido unido à p-nitroanilina ao lisado de amebócitos de *Limulus*, reagente do ensaio de LAL, quando há endotoxinas no meio, a solução toma uma certa tonalidade, pelo que se pode detetar a presença de endotoxinas através de um método cromogénico. Neste caso torna-se necessário a utilização de um espectrofotómetro para quantificar a concentração de corante libertado como produto da reação enzimática. ¹¹

O ensaio é efetuado segundo o método cinético cromogénico que consiste em determinar a quantidade de cromóforo libertado por um peptídeo cromogénico formado aquando a reação das endotoxinas com o lisado. Através da colorimetria pretende-se determinar o tempo necessário para a reação atingir uma absorvência previamente definida na velocidade de desenvolvimento de coloração. Estes parâmetros são medidos através de um espectrofotómetro específico para leitura no comprimento de onda da cor amarela, cor esta que se forma na reação da endotoxina com o lisado de amebócitos.

Para o ensaio ser válido tem de apresentar uma taxa de recuperação dentro de um intervalo específico, e o valor do declive da curva padrão deve ser superior a um valor previamente determinado. A amostra está conforme se a quantificação de endotoxinas estiver de acordo com a sua especificação para o respetivo produto. Este ensaio é realizado em condições específicas de modo a evitar qualquer contaminação possível por endotoxinas, estando assim toda a aparelhagem, material de acondicionamento e reagentes utilizados sujeita a condições específicas de esterilidade, sendo importante a despirogenação dos mesmos, para deste modo evitar contaminações.

A despirogenação do material de vidro reutilizável é realizada em estufa de ar quente a 250°C durante cerca de 30 minutos. Aquando a realização do ensaio, são aplicadas numa microplaca as amostras a verificar em quadruplicado, os padrões com duas diluições diferentes em duplicado e um branco, igualmente aplicado em duplicado. Estas últimas irão servir de meio de comparação e controlo do ensaio.

É ainda importante a validação do método, que é realizada previamente para as várias substâncias a analisar. Entre outros parâmetros, na validação avalia-se também a diluição aplicável à amostra para que não haja interferências na quantificação.

O ensaio de quantificação de endotoxinas é aplicado a amostras de produtos obrigatoriamente estéreis, como são exemplo as formas farmacêuticas injetáveis, as matérias-primas utilizadas para tal, material de embalagem primário, como por exemplo rolhas, águas WFI e ainda a amostras de produtos em que, estando em validação, este ensaio se aplique, como foi referido anteriormente.

3.5. ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS NÃO ESTÉREIS

A presença de alguns microrganismos em preparações não estéreis pode ter a capacidade de reduzir ou mesmo inativar a atividade terapêutica do produto e afetar de modo adverso a saúde do consumidor.

A avaliação microbiológica de produtos não estéreis (matéria-prima e produto final) permite verificar a presença ou ausência de microrganismos patogénicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função do tipo de utilização do produto.

Através de um procedimento rigoroso onde são utilizados 10g ou 10ml da amostra, pesa-se ou pipeta-se esta quantidade para um meio de TSA. Este meio é incubado a 30-35°C durante 24 horas. Ao realizar-se a pesquisa normal de fungos e bactérias, passado o período de incubação, é transferido 1ml do meio líquido para meio de TSA e de SDA em duplicado. Estas placas são incubadas durante o tempo necessário para que ocorra crescimento microbiano, sendo de três dias e cinco dias, respetivamente.

Além deste processo, para a grande parte dos produtos é obrigatória a pesquisa de microrganismos específicos, nomeadamente *Escherichia coli*, entre outros. Como tal recorrem-se a meios seletivos para a pesquisa de *Escherichia coli* transfere-se 1ml do meio inicial para meio líquido de Mac Conkey para o meio sólido. Utilizam-se outros meios como Cetrimida agar para pesquisa de

Pseudomonas, Chapman 2 agar para *Staphylococcus*, XLD agar para *Salmonella*, e VRBGL agar para *Enterobactérias*. Estes são incubados cerca de 24 horas a 30-35°C.

Os resultados são observados e avaliados após o término do período de incubação. Quando ocorre crescimento microbiológico procede-se à identificação de microrganismos, e da avaliação dos resultados finais há a aprovação ou rejeição do produto.

3.6. IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A identificação de microrganismos é realizada sempre que se encontre crescimento microbiano nos meios de crescimento relativos aos ensaios realizados, quando ocorre é definido em procedimento técnico, e quando os resultados ultrapassam os limites definidos. A pesquisa de microrganismos no laboratório de microbiologia da Labesfal baseia-se unicamente nas características fenotípicas dos mesmos, tendo em conta os seus aspetos macroscópicos e microscópicos, as características de crescimento e características bioquímicas e propriedades metabólicas.

A identificação de microrganismos contaminantes tem enorme importância na indústria farmacêutica pois permite identificar a origem dos organismos, permitindo assim que se atue sob o foco de contaminação.

A identificação de microrganismos deve ser realizada em condições de assepsia e na câmara de segurança biológica para evitar a contaminação do analista.

O laboratório possui um sistema automatizado baseado num método fenotípico: o VITEK®2 Compact que se destina à identificação de bactérias e leveduras. Este sistema combina tarefas de inoculação, incubação e leitura de cartas. O VITEK®2 Compact executa as análises de identificação através da monitorização contínua do crescimento e da atividade dos microrganismos no interior dos poços das cartas. Este sistema destina-se à identificação de bactérias e leveduras e à realização de testes de sensibilidade de bactérias.

3.6.1. Repicagem e isolamento

A primeira fase de uma correta identificação é caracterizar individualmente um microrganismo e para isso é necessário que este se encontre em cultura inicial. Assim sendo, procede-se à transferência de material microbiano do meio de origem, podendo ser uma placa contaminada ou um meio líquido, utilizando-se a técnica de espalhamento ou o método riscado. O processo inicia-se com o retirar de uma amostra do inóculo e é transferido para uma placa com um meio de TSA quando se trata de bactérias, ou com meio de SDA quando se trata de fungos e leveduras. Todo este processo é realizado numa câmara biológica de fluxo laminar com as respetivas normas de assepsia. O processo continua com a incubação durante o tempo necessário para se obter crescimento microbiano das placas anteriormente repicadas.

Porém, a simples observação da morfologia das colónias é muitas vezes insuficiente para a identificação das espécies, recorre-se por isso à sua observação ao microscópio.

3.6.2. Testes de diferenciação macroscópica e microscópica e morfológicos

A diferenciação inicial entre as bactérias pode ser realizada pelas características do crescimento em diversos meios nutrientes e seletivos. As bactérias crescem em colônias que são normalmente compostas por milhões de microrganismos. A soma das suas características determina as características diferenciais como a cor, tamanho, forma e odor. Utilizando meios de cultura adequados, podem ser determinadas a capacidade de resistir a certos antibióticos, de fermentar açúcares específicos (por exemplo, a lactose na diferenciação entre *E.coli* de *Salmonella*), de lisar hemácias (propriedades hemolíticas) ou de hidrolisar lípidos.⁸

Para facilitar a pesquisa do grupo a que pertencem os microrganismos são realizados alguns testes simples com o intuito de recolher informação para a identificação realizada pelos equipamentos disponíveis.

O teste de coloração de *Gram* em bactérias sendo este dos testes mais relevantes a realizar, já que permite a diferenciação entre as duas mais importantes classes de bactérias: *Gram-negativo* ou *Gram-positivo*.

A técnica de *Gram* ou coloração de *Gram* é uma técnica de coloração para observação ao microscópio ótico, utilizada para corar diferencialmente microrganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular. As bactérias são fixadas pelo calor na superfície de uma lâmina e consoante a cor que adquirem, os microrganismos são classificados em *Gram-positivos* (roxo) ou *Gram-negativos* (rosa). A diferente coloração obtida deve-se à diferença na espessura da camada de peptidoglicano existente na parede bacteriana. Assim, a camada espessa das *Gram-positivas*, depois de colapsar sob o efeito desidratante do etanol, não permite a saída do corante, um complexo formado pelo cristal violeta e pelo iodo. Contrariamente, a camada fina das *Gram-negativas* mesmo colapsada não evita a saída do corante, ficando a célula incolor, e por isso a necessidade de usar um segundo corante contrastante – a safranina.

Uma bactéria *Gram-positiva* tem uma camada de peptidoglicano espessa que contém ácidos teicoicos solúvel em água sendo essencial para a viabilidade celular e ácidos lipoteicoicos que são ancorados na membrana citoplasmática. Possui uma parede celular espessa em múltiplas camadas constituídas principalmente por peptidoglicano envolvendo a membrana citoplasmática. O peptidoglicano da célula é suficientemente poroso para permitir a difusão de metabolitos para a membrana plasmática. O peptidoglicano é essencial para a estrutura, para a duplicação e para a sobrevivência em condições normalmente hostis nas quais as bactérias crescem. Uma bactéria *Gram-negativa* tem uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas que mantém a estrutura bacteriana e serve como barreira de permeabilidade às grandes moléculas (como a lisozima que se caracteriza por ser uma enzima presente na lágrima e no muco de humanos, mas também é produzida por bactérias e por outros organismos que é capaz de degradar o peptidoglicano) e a moléculas hidrofóbicas. O espaço periplasmático entre as membranas citoplasmática e externa contém proteínas de transporte e síntese

de parede celular. A membrana externa é acoplada à membrana citoplasmática em pontos de adesão e é presa ao peptidoglicano por lipoproteínas de ligação.⁸

Depois de realizado o teste de coloração de *Gram*, são então realizados ensaios complementares, com base no resultado deste. Realiza-se assim a observação microscópica da preparação realizada durante a coloração de *Gram* para a obtenção de resultados fiáveis, e analisa-se desta forma também a morfologia das bactérias em pesquisa, dada a sua aparência classificam-se assim em três grandes grupos: cocos, bacilos e cocobacilos.

É realizada ainda a coloração de esporos com solução de verde malaquita em bactérias *Gram*-positivo, nomeadamente bacilos, e a coloração de fungos, depois de se recolher o material microbiológico com azul de lactofenol, igualmente para observação ao microscópico, sendo que ao tratar-se de fungos a sua identificação microscópica efetua-se por comparação a imagens apresentadas no procedimento técnico.

3.6.3. Diferenciação Metabólica

Através do perfil metabólico e características bioquímicas dos microrganismos é possível identifica-los de forma mais rigorosa, e com uma taxa de incerteza baixa, nomeadamente no que respeita a bactérias. A sua identificação é efetuada em equipamentos automatizados e específicos para tal, sendo apenas necessária a preparação do material biológico para colocar em microplacas compatíveis com os aparelhos, as quais possuem nos seus poços nutrientes e substâncias específicas. É como tal necessário aquando a preparação do material a utilizar saber qual o tipo de microrganismo em questão (bactéria ou fungo), e qual a sua subdivisão no caso de se tratar de pesquisa de bactérias, para assim utilizar uma microplaca compatível com o microrganismo, uma vez que a utilização universal seria impraticável, dadas as diferentes exigências dos vários tipos de microrganismos.

É na câmara biológica que se procede à preparação da solução que posteriormente se irá inserir na microplaca. O material biológico é inserido num tubo de *Falcon* com uma solução de cloreto de sódio, agitando-se, e lendo-se a absorvância, tendo esta limites definidos no procedimento técnico, que indica assim a quantidade de material viável para que a identificação através do aparelho seja realizada com sucesso.

O aparelho utilizado como referido anteriormente, baseia-se no princípio do perfil bioquímico dos microrganismos com uma base de dados. O Vitek® é um aparelho com tecnologia mais recente, utilizado apenas para identificação de bactérias. Este equipamento transfere a solução de material biológico para as microplacas, que são muito mais específicas para vários subgrupos de bactérias e incuba as microplacas, rejeitando o material de preparação das mesmas. Tem uma base de dados mais abrangente e completa, dando taxas de incerteza muito baixas. Por vezes, a identificação apresenta mais que uma opção de resultado para a identificação em questão, sendo necessário realizar testes de natureza bioquímica ou morfológica indicados pelo programa para completar a identificação.

No final de todos os testes envolvidos neste processo de identificação de microrganismos, avaliam-se os resultados obtidos. Tem-se em conta a incerteza indicada pelo aparelho na identificação

pretendida, de forma a concluir se o microrganismo está identificado, ou se os resultados não garantem que se obtenha uma identificação fiável. Quando não era possível identificar o microrganismo, o mesmo era enviado para uma entidade exterior que realiza a identificação através da sua Genotipagem. Sendo esta alternativa, usada também para identificação de fungos.

CONCLUSÃO

Com este relatório foi possível a descrição e discussão das principais atividades desenvolvidas e competências adquiridas ao longo do estágio, bem como, a descrição do importante papel do operador e/ou analista na preparação, execução e análise das mesmas.

Na indústria farmacêutica, alguns pontos são fundamentais em todos os testes realizados no que diz respeito ao controlo de qualidade microbiológica. Os registos efetuados que são feitos antes, durante e após o ensaio são de grande importância para a avaliação dos resultados, tal como a monitorização e controlo de qualidade dos mesmos nos ensaios realizados. Todos os ensaios devem ter em conta os procedimentos e recomendações mencionados nas farmacopeias, quer aquando a sua execução, mas também na preparação dos materiais, reagentes e meios, e nas condições ambientais em que são realizados.

A análise das metodologias executadas durante o estágio, mostra bem a importância do operador em todas as fases da análise microbiológica na indústria farmacêutica, e como é possível com este estudo, alterar e melhorar os procedimentos executados, para um maior rigor e confiança nos resultados obtidos. O operador deve, por isso, ser o principal crítico no que diz respeito ao trabalho que executa e às evidências observadas.

As principais limitações sentidas durante este percurso, prenderam-se com a impossibilidade de execução de testes de esterilidade devido ao seu rigor de execução e sobretudo por só ser permitido a sua realização a analistas previamente avaliados.

Contudo, foi de extrema importância a integração num grupo de trabalho empenhado e competente que promoveu o interesse por esta área de atividade. Foram fundamentais no apoio prestado em todas as fases do estágio. Foi importante contactar com dificuldades do dia-a-dia pois permitiram que desenvolvesse e aprofunda-se as competências necessárias para a inserção numa atividade profissional.

Em jeito de conclusão, é possível afirmar que os objetivos propostos aquando da realização deste estágio foram alcançados, não só pela aquisição de conhecimentos e metodologias de trabalho importantes no controlo de qualidade microbiológica na indústria farmacêutica, como também pelas sugestões propostas com a análise dos resultados obtidos, que no conjunto contribuíram para o crescimento pessoal, científico e profissional.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Escola Superior de Saúde, I.P.G. (2014). Regulamento específico de ESTÁGIO PROFISSIONAL I.
- 2- Guia de Elaboração e Apresentação de Trabalhos Escritos de 2008 da ESS- IPG. (s.d.).
- 3- LABESFAL Laboratórios Almiro, SA. (2015). Manual de Acolhimento. Santiago de Besteiros
- 4- Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. F. (1998). *Microbiologia – volume 1*. Lidel – Edições Técnicas.
- 5- Sutton, S.; Singer, D.C. (2011). Microbiological Best Laboratory Practices.
- 6- Sandle, T. (2012). Introducing Pharmaceutical microbiology and Pharmig. *Innovation Into Success*.
- 7- Eudralex. (2012). Chapter 1 - Pharmaceutical Quality System - Volume 4. Em *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*. Bruxelas: European Commission.
- 8- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (n.d.). *Microbiologia Médica*. Mosby Elsevier
- 9- Trablusi, L. R., & Alterthum, F. (n.d.). *Microbiologia 4ª Edição*. Atheneu.
- 10- Hanlon, G., & Hodges, N. (2013). *Essential Microbiology for Pharmacy and Pharmaceutical Science*. University of Brighton, UK: School of Pharmacy and Biomolecular Sciences .
- 11- Wako Chemicals USA, I. (2008). *Pyrostar*. Retrieved from <http://www.wakopyrostar.com/>