

## A IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS MICROBIOLÓGICOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

### *THE IMPLEMENTATION OF RAPID MICROBIOLOGICAL METHODS IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY*

BORIN, Isabella<sup>1</sup>; MARTINS, Victor<sup>1</sup>; TAKETANI, Natália Franco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduandos do Curso de Farmácia – Universidade São Francisco; <sup>2</sup>Professor do Curso de Farmácia – Universidade São Francisco.

[isabella.capellato@hotmail.com](mailto:isabella.capellato@hotmail.com)

**RESUMO.** Existem grandes desafios que envolvem as etapas de fabricação e desenvolvimento da indústria farmacêutica, nos últimos anos houveram muitas mudanças na área microbiológica. O avanço da tecnologia, da biologia molecular e da imonoquímica possibilitaram a evolução da microbiologia farmacêutica, além do atual crescimento explosivo da biotecnologia, de modo que biofármacos clinicamente importantes podem agora ser produzidos por linhagens de células de insetos, plantas, bactérias. Embora possivelmente sempre haja lugar para os métodos tradicionais, a microbiologia deve adaptar-se as mudanças da indústria. Os métodos microbiológicos rápidos fornecem várias vantagens principalmente em relação a rapidez dos resultados de análises, que proporcionam melhor controle e compreensão do processo produtivo com um feedback mais rápido. Os métodos podem ser classificados quanto as suas formas e funções, além disso é necessária uma rigorosa validação para garantir que o método seja adequado a finalidade pretendida, com padrões de segurança e qualidade. Dependendo se o teste é de identificação, qualitativo ou quantitativo os elementos para validação podem variar. É preciso demonstrar a equivalência do método rápido ao método convencional, visto que há impasses regulatórios para sua implementação. O objetivo desse trabalho é uma revisão bibliográfica com avaliação na literatura científica e nos dados da Comissão *European Pharmaceutical Review* da possibilidade do uso de técnicas rápidas em microbiologia, em análises microbiológicas na indústria farmacêutica. Diante da pesquisa realizada foi possível identificar técnicas que trazem vantagens em termos de rapidez e resolução para estudos de identificação microbiana, esterilidade e endotoxina.

**Palavras-chave:** Microbiologia; Métodos Rápidos; Indústria Farmacêutica.

**ABSTRACT.** There are major challenges that involve the manufacturing and development stages of the pharmaceutical industry, because of that there were many changes in the microbiological area on the past few years. Advances in technology, molecular biology and immo-chemical have enabled the evolution of pharmaceutical microbiology in addition to the current explosive growth of biotechnology, so that clinically important biopharmaceuticals can now be produced through insect cell lines, plants and bacteria. While there may always be room for traditional methods, microbiology must adapt itself to the changing industry. Rapid microbiological methods provide several advantages, particularly in terms of rapid analysis results, which provide better control and understanding of the production process with faster feedback. The methods can be classified according to their forms and functions, and a rigorous validation is necessary to ensure that the method is suitable to the intended purpose, with the required safety and quality standards. Depending on whether the test is for identification or qualitative and quantitative measurements, the elements for validation may vary. It is then necessary to demonstrate the equivalence of the fast method to the compendial method, since

there are regulatory impasses for its implementation. The objective of this work is a bibliographical review with evaluation of the scientific literature and of the data from the European Pharmaceutical Review Commission to confirm whether it is possible to use the rapid techniques in microbiology and in microbiological analyzes on the pharmaceutical industry. According to this research, it was possible to identify techniques that bring advantages in terms of speed and resolution for studies of microbial identification, sterility and endotoxin.

**Keywords:** Microbiology; Rapid Methods; Pharmaceutical Industry.

## INTRODUÇÃO

Provavelmente a microbiologia é a mais antiga das ciências aplicadas, os verdadeiros precursores da microbiologia, como é reconhecido hoje, seriam Kock, Pasteur, Petri et al, que desenvolveram muito do nosso conhecimento básico sobre o assunto e muitos dos métodos microbiológicos que ainda estão em uso. Nesse período intermediário, nosso conhecimento da genética humana e microbiana aumentou dramaticamente e a exploração desse conhecimento levou ao atual crescimento explosivo da biotecnologia, de modo que biofármacos clinicamente importantes podem agora ser produzidos por linhagens de células de insetos, plantas, bactérias, mamíferos ou de fato, no leite de bovinos. Embora possivelmente sempre haja lugar para os métodos tradicionais, a microbiologia deve adaptar-se as mudanças da indústria (GREEN, 2008). No contexto da era microbiológica, o século 20 é aquele responsável pelos grandes avanços de estudos fisiológicos e moleculares, por exemplo no desenvolvimento de meios de cultura seletivos e diferenciais, virologia, genética microbiana e metabolismo microbiano. Já o século 21, é representado pela Era dos MMR (métodos microbiológicos rápidos) em que as indústrias alimentícia e de clínica médica vem apresentando considerável avanço frente a aplicabilidade dessas novas tecnologias (EPR, 2018)

Nos últimos anos houve muitas mudanças na microbiologia farmacêutica com o desenvolvimento desses métodos microbiológicos rápidos instituindo uma área da microbiologia em constante evolução. Boa parte desses avanços provém da tecnologia de equipamentos, programas de computador e bancos de dados, biologia molecular e imunoquímica. Além da ascensão de outras áreas de pesquisa científica e biotecnologia. Os métodos microbiológicos rápidos podem ser definidos como técnicas específicas destinadas a detecção, determinação e caracterização de organismos através do qual os resultados podem ser obtidos em um tempo muito mais rápido do que os métodos convencionais (LEOTTA, 2009)

Caracteristicamente os métodos rápidos são metodologias qualitativas e quantitativas com particularidades fisico-químicas, bioquímicas, imunológicas e moleculares. Seu crescimento é evidenciado na estratégia oferecida de aquisição de resultados rápidos e precisos. O estudo dos genótipos bacterianos, se tornou rápido e possível de ser realizado em testes microbiológicos diários, exemplificando uma mudança em procedimentos com padronização, velocidade, reprodutibilidade, mecanização e automação (LEOTTA, 2009)

Ainda, os métodos microbiológicos rápidos podem ser classificados com base em suas várias formas e funções. A classificação baseada em formas refere-se ao meio pelo qual são realizadas etapas processuais na detecção de um microrganismo, espécie ou gêneros de um microrganismo, podendo ser então classificados em sistemas bioquímicos ou químicos manuais (kits) e sistemas mecanizados ou automatizados. Quanto a classificação baseada nas funções isso simplesmente se refere a essência prática, ao propósito de um método microbiológico rápido em particular, podendo ser classificados em métodos de Identificação Microbiana, métodos Quantitativos e métodos Qualitativos (OGUNLEYE, 2016).

A identificação de microrganismos é o papel principal do microbiologista e para isso existem métodos rápidos que atuam na extração e sequenciamento do genoma de um organismo em tempo real, contribuindo primordialmente na classificação de microrganismos conhecidos e desconhecidos. O GeneXpert é um exemplo de teste rápido de diagnóstico automatizado que pode detectar e estimar a tuberculose bem como o grau de virulência de cepas potenciais. Neste teste molecular rápido baseado em cartuchos são encontrados muitos pontos positivos que colaboram para um diagnóstico veloz e eficaz (LIMA et al., 2017). Outro exemplo para testes de identificação microbiana é a técnica de MALDI-TOF, utilizada através do tempo de ionização de desorção de luz por matriz de espectrometria de massa (MURDOCH, 2018). Mas, existem também uma variedade de métodos rápidos qualitativos que auxiliam no diagnóstico fácil de organismos causadores de efeitos sindrômicos e choque séptico, propondo assim resultados breves que em casos de emergência vão colaborar para que os tratamentos sejam rápidos. E ainda temos os métodos quantitativos que quantificam microrganismos por tecido, unindo microscopia de fluorescência com citometria de fluxo, coloração de viabilidade, isto é, conectam tecnologia com métodos práticos de contagem de microrganismos (PARILLO, 1993).

Contudo, existem grandes desafios que envolvem as etapas de desenvolvimento e fabricação da indústria farmacêutica, a busca de levar os produtos ao mercado em um tempo mais rápido e ao mesmo tempo cortar custos durante o andamento do processo produtivo vem sendo o maior obstáculo das farmacêuticas. Nesse cenário, o controle de qualidade é fundamental em todos os estágios do desenvolvimento do produto pois ele é responsável por assegurar que todo o processo de produção ocorra dentro das Boas Práticas de Fabricação, ou seja, deve garantir que os produtos sejam produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido, seguindo sempre as resoluções e normativas dos órgãos regulatórios nacionais como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e outros internacionais como o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) além dos compêndios farmacopeicos (ANVISA, 2010).

Em alguns eventos como a 11ª Conferência anual de Microbiologia Farmacêutica em Portugal foram destacados a implementação propriamente dita dos métodos rápidos microbiológicos. As discussões apontam para uma aceitabilidade dos órgãos regulatórios, mas certos aspectos do modo como são validados dificultam essa anuência pelos reguladores. Pelas constatações dos profissionais presentes no evento foi possível compreender que se uma estratégia de validação for usada pelas industriais os reguladores aceitariam os métodos microbiológicos rápidos como alternativas aos métodos compendiais, pois as metodologias tradicionais e mais antigas requerem uma atualização, visto que já tem muitos anos que os métodos foram preconizados nas farmacopeias (MILLER, 2017).

No entanto, as companhias ainda hesitam em implementar os métodos rápidos devido ao desejo de não alterar dossiês regulamentares já aprovados, a percepção dos custos de implementação, e principalmente ao medo de mudança. Porém muitas empresas multinacionais que fabricam e distribuem produtos farmacêuticos já validaram com sucesso métodos rápidos microbiológicos no âmbito da qualidade do produto e da segurança do paciente e obtiveram êxito nas aprovações. Desse modo, há o desejo de capitalizar essas conquistas de sucesso, e promover a importância do esforço das empresas para que os métodos sejam implantados e que os inspetores regulatórios os conheçam (MILLER, 2017).

Uma das avaliações mais difíceis de se fazer quando se implementa qualquer nova tecnologia é a da relação custo-benefício. Ninguém toma decisões de compra baseadas apenas na tecnologia. Para uma produção de medicamentos mais eficiente do ponto de vista financeiro, não há melhor maneira de atingir esse objetivo do que tirar vários dias dos ciclos de fabricação. Inovação e novas abordagens na ciência são requisitos para ser líder em qualquer setor.

Contudo, outras competências de liderança buscam melhorias em rentabilidade e qualidade. Tempo, custo e trabalho estão todos incluídos em uma avaliação de custo/benefício que deve ser realizada para qualquer nova tecnologia que esteja sendo considerada para desenvolvimento ou implementação, como por exemplo no caso dos métodos microbiológicos rápidos (LLOYD, 2006).

No geral, a adoção dos métodos é interposta pelas diretrizes regulatórias pois um novo método deve claramente ser pelo menos equivalente ao método atualmente validado ou mais eficaz que o mesmo. Os métodos já existentes são encontrados nos compêndios, então vários critérios são avaliados para determinar a equivalência entre um e outro. Dependendo se o teste é de identificação, qualitativo ou quantitativo os elementos para validação podem variar. Dentre os princípios envolvidos na validação de um método rápido estão basicamente a precisão, especificidade, a linearidade, e o vigor do método (MILLER, 2017).

Iniciativas vindas do FDA, órgão regulamentar internacional responsável pela administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos têm contribuído para a ascensão regulatória dos métodos rápidos. Entre as iniciativas está a tecnologia analítica de processo, o PAT (*Process Analytical Technology*), elaborado com o intuito de motivar a indústria a usar tecnologias inovadoras para analisar e controlar os processos de fabricação através da medição de parâmetros críticos do processo que afetam os atributos de qualidade. Essa iniciativa descreveu um marco regulatório que incentivou o desenvolvimento voluntário e a implementação de abordagens inovadoras no desenvolvimento farmacêutico. O PAT tem por objetivo a garantia contínua da qualidade em tempo real e os usuários são incentivados a discutirem o uso proposto dos novos métodos em reuniões com a agência internacional (FDA, 2003; MILLER, 2019).

Outro programa com impacto para área de microbiologia farmacêutica é o *Pharmaceutical cGMP* (normas atuais de boas práticas de fabricação) concretizado pelo FDA. Vários aspectos desse projeto são úteis para o avanço da microbiologia rápida, o treinamento específico para instalações farmacêuticas é um deles. (FDA, 2003) As empresas que introduziram o PAT em suas operações de rotina perceberam tempos de ciclo de produção reduzidos, eliminaram reprocessamento, usaram estratégias de liberação em tempo real, obtiveram ganhos significativos em sensibilidade de detecção, automação e rendimento. Além disso, ao substituírem seus métodos clássicos por tecnologias alternativas desfrutaram de um maior ROI (retorno sobre o investimento) (MILLER, 2019).

Os métodos rápidos têm um enorme potencial de aplicação, o teste de esterilidade é um exemplo, seguindo os compêndios ele tem um período de incubação de 14 dias mais o tempo de revisão e análise dos resultados. Caso ocorra algum problema no teste ainda se faz necessário um tempo de investigação adicional que pode levar ainda mais tempo até a liberação final do produto. Isso acarreta o atraso dos resultados da análise fazendo com que o produto possa entrar no mercado pela liberação paramétrica, exigindo então uma atenção especial. Diferentemente disso, o mais recente método rápido pode concluir a análise em apenas 7 dias, reduzindo pela metade o tempo necessário para gerar esses resultados imprescindíveis (MURDOCH, 2018).

Um exemplo bem-sucedido da aplicabilidade dos métodos rápidos é o teste de determinação de endotoxinas bacterianas baseado no uso do lisado de amebócitos limulus - LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) que foi o primeiro método rápido a tornar-se farmacopeico, com aprovação regulatória. Em vista disso, novas tecnologias desenvolveram o uso de um sistema de teste rápido portátil de endotoxina para a análise de amostras biofarmacêuticas, como matérias primas e produtos acabados. (MURDOCH, 2018) (MILLER, 2010)

Além disso, temos ainda os métodos rápidos para monitoramento ambiental e detecção de partículas viáveis em tempo real, que agregam muito na rotina microbiológica farmacêutica,

além de contribuir para um bom desempenho na avaliação dos parâmetros críticos das áreas. Atendendo assim, a um mercado global para investigação, identificação e resolução de problemas de medição de partículas. Atualmente a maneira mais comum de estimar a qualidade do ar é o com o uso de placas de Petri contendo ágar TSA (*trypticase soy agar*), o tempo de exposição da placa ao ar do ambiente varia. Os microrganismos então, se depositam na placa durante a incubação em estufa. As informações por esse método tradicional não são muito quantitativas, embora ele seja simples. Os novos métodos chegam trazendo rapidez e automatização na medição de partículas com equipamentos altamente desenvolvidos (GOVERDE, 2013).

As mudanças nos métodos microbiológicos foram impulsionadas pela introdução de tecnologias facilitadoras que esclarecem a necessidade de amplificação biológica. Diante disso, existe um esforço internacional através de uma comissão, a *European Pharmaceutical Review* que impulsiona o desenvolvimento de técnicas rápidas em microbiologia, e presente trabalho tem como objetivo fazer uma avaliação na literatura científica da possibilidade da aplicação e da implementação dessas técnicas em análises microbiológicas na indústria farmacêutica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado por meio de uma revisão bibliográfica que se fundamenta em procedimentos de coleta e análise de dados através de plataformas científicas como a Comissão *European Pharmaceutical Review*, FDA, ANVISA, EMA (*European Medicines Agency*), PDA (*Parenteral Drug Association*), Google Acadêmico, Pubmed, Scielo, *Web of Science* e Revistas científicas. Os materiais que levaram a obtenção dos resultados foram pesquisados nos idiomas português, inglês e espanhol. Além disso, buscou-se publicações sobre a temática no período de 1993 a 2019, especialmente nos anos mais recentes visto a inovação das metodologias estudadas. Os presentes artigos referenciados foram retirados de bases internacionais e nacionais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O interesse em métodos microbiológicos rápidos no setor farmacêutico cresceu consideravelmente. Os métodos convencionais usados para enumerar e identificar microrganismos em produtos farmacêuticos estão longe de serem modernos. De fato, eles existem desde a última parte do século XIX e foram altamente bem-sucedidos, baratos e simples de executar. Mas, infelizmente eles também são trabalhosos, levam muito tempo para produzir resultados e requerem interpretação especializada. Além do que, eles são impossíveis de automatizar e nunca fornecerão dados em tempo real para um controle de processo preciso e responsivo. Por isso, há uma necessidade real agora para a introdução de novos métodos que podem atender as exigências de uma indústria altamente tecnológica no século XXI. Não é mais apropriado usar técnicas antigas em uma indústria farmacêutica moderna. É o momento mais adequado para a adoção de novos métodos microbiológicos rápidos que fornecerão soluções para as necessidades atuais e futuras. Diante disso, a luz da literatura científica demonstrar as características através de um comparativo dos principais parâmetros de análises dos métodos rápidos e tradicionais pode esclarecer e evidenciar a atual situação (WOODCOOK, 2004).

Os métodos microbiológicos são divididos em métodos de determinação, quantificação e identificação. As análises podem ser do tipo quantitativas ou qualitativas. A validação e o tratamento estatístico de dados são um dos fatores fundamentais na introdução de um novo método. As metodologias de testes rápidos apresentam confiabilidade e especificidade elevada,

além de reduzirem o número de etapas de trabalho, e diminuïrem o erro analítico, melhoram principalmente a qualidade dos processos (BRASIL, 2010).

Os testes encontrados foram organizados em forma de tabela, mostradas abaixo, e os parâmetros de comparação foram a sua classificação (tipo de método), eficácia (o método em questão permite uma análise qualitativa ou quantitativa das amostras), tempo (restringido aqui, ao tempo necessário para obtenção de resultado), demanda (capital necessário), otimização de recursos (tais como geladeira, autoclave, energia, espaço em geral), precauções (alguns cuidados, se existirem) e considerações gerais sobre os métodos em questão. A seguir, serão descritos alguns destes métodos e, com base no escopo deste trabalho, serão confrontados uns com os outros a fim de se elencarem suas vantagens e desvantagens.

Os métodos de identificação microbiana possuem alternativas metodológicas para sua realização, e estão intimamente relacionados, dividindo-se entre os métodos rápidos ou tradicionais. A identificação microbiana está tradicionalmente relacionada à utilização de testes diagnósticos, ou provas bioquímicas, os quais nos permitem realizar comparações fenotípicas, como por exemplo, motilidade, ou metabolismo de substratos específicos, e agrupar os microrganismos de acordo com suas semelhanças e diferenças, e a partir disso nomeá-los e/ou diferenciá-los (MADIGAN, 2016). O Quadro Comparativo 1 abaixo, comprova as principais diferenças entre os métodos de identificação a partir dos parâmetros pesquisados.

Apesar de bem elucidada, as séries bioquímicas tradicionais de identificação são trabalhosas e demandam tempo para obtenção de resultados, os inóculos necessitam ser puros e outra limitação da técnica é que ela permite identificar apenas os microrganismos que são cultiváveis em laboratório, em condições artificiais (CÂNDIDO; TUNON; CARNEIRO, 2010).

No que diz respeito à proteômica, o método analítico MALDI-TOF merece destaque, pois permite a identificação de microrganismos com base nas proteínas e peptídeos que os compõe e que conseqüentemente são restritos às suas categorias taxonômicas, contudo, a técnica ainda exige o crescimento do microrganismo em placa, podendo a amostra ser aplicada direta sobre o equipamento ou então processada. Ainda segundo pesquisado, a técnica possui inúmeras outras vantagens, tais como a possibilidade de análises em larga escala, a baixa quantidade de amostra biológica necessária para obtenção de resultados, e o tempo de acurácia de resultados, que é de aproximadamente 30 segundos. Contudo, autores salientam que a técnica é dependente de bancos de dados de proteomas microbianos, podendo gerar custos muito elevados, além da dificuldade de se processarem amostras de micro-organismos com paredes e membranas celulares espessas (ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011).

Por sua vez, a identificação microbiana por meio de testes moleculares pode ser exemplificada também pelo sistema GeneXpert, outra metodologia rápida e alternativa, fundamentada nas técnicas de PCR multiplex em tempo real e *nested-pcr*, a qual permite amplificar mais de um gene de interesse, e até mesmo genes de resistência antimicrobiana, contudo há a uma limitação de genes por ensaio, as amostras são diluídas em um tampão específico, inseridas em cartuchos descartáveis e em seguida alocadas dentro do equipamento que realiza desde a extração do material genético, até a emissão do resultado, que varia em torno de 45min à 1h. (BRASIL, 2014).

**Quadro 01 - Comparação de métodos de Identificação microbiana.**

Parâmetros Comparativos	GeneXpert Genético	Maldi-Tof Proteômico	API Sistema Miniaturizado	Séries Bioquímicas de Identificação
<b>Tipo do método</b>	Rápido	Rápido	Rápido	Convencional
<b>Eficácia</b>	Qualitativo	Qualitativo	Qualitativo	Qualitativo
<b>Tempo</b>	Liberação de resultado varia de 45min à 1h	30seg (depois de crescimento em placa)	18-24h	3-7dias no mínimo
<b>Demanda</b>	Alta	Muito alta	Alta	Baixa
<b>Otimização de recursos</b>	Sim	Sim	Sim	Não
<b>Precauções</b>	-	-	As culturas devem estar isoladas e puras	Deve permitir detecção de inóculos < 100 UFC
<b>Considerações gerais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitação de pesquisa de genes</li> <li>- Altamente específico</li> <li>- Detecção de genes de resistência</li> <li>- ↓ produção resíduos</li> <li>- Evita contaminações de testes cruzados</li> <li>- De fácil execução</li> <li>- Não necessita de pessoal especializado</li> <li>- Detecta uma variedade de micro-organismos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓ produção resíduos</li> <li>- Análises em larga escala</li> <li>- Fungos e micro-organismos com parede espessa dificultam a análise</li> <li>- Dependência de banco de dados</li> <li>- ↓ quantidade de material biológico</li> <li>- Resultados em curto espaço de tempo</li> <li>- Espécie-específico (“<i>fingerprinting</i>”)</li> <li>- Detecta uma variedade de micro-organismos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prático e rápido</li> <li>- Confiável e Validado</li> <li>- ≠ kits para ≠ grupos de bactérias/leveduras</li> <li>- Software que auxiliam a organização de resultados para identificação</li> <li>- Não necessita de infraestrutura específica</li> <li>- Redução do tempo de incubação</li> <li>- Pouco específico para fungos, em geral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ≠ meios de cultura</li> <li>- ≠ temperaturas de incubação</li> <li>- Bem estabelecidos</li> <li>- Identificação de todos os grupos de micro-organismos, desde que sejam cultiváveis</li> <li>- Apenas manifestações fenotípicas em condições restritas</li> <li>- Demandam muito tempo</li> </ul>
<b>Referências</b>	BRASIL, 2014	ASSIS; JULIANO; JULIANO, 2011	BRAZ, 2010 BIOMÉRIEUX, 2018	MADIGAN, 2016; CÂNDIDO; TUNON; CARNEIRO, 2010

Fonte: Próprio autor

Os sistemas miniaturizados, como o API (Índice de Perfil Analítico), por exemplo, talvez sejam os métodos rápidos mais difundidos em escala laboratorial. Baseado nos conceitos bem estabelecidos das séries bioquímicas tradicionais, este sistema miniaturizado na forma de canaletas opera de forma semelhante, mas em pequena escala de reagentes, utilizando-se de suspensões bacterianas, que necessitam estar isoladas, preferencialmente, e os resultados são tabelados e a estes são atribuídos valores, que quando agrupados, permitem que identifiquemos os microrganismos, sob um princípio semelhante de chave taxonômica de identificação de espécies, mas de maneira semi-automatizada e baseada em caracteres morfológicos (bioquímicos) (BRAZ, 2010; BIOMÉRIEUX, 2018).

Entretanto, outros testes também de extrema importância para indústria farmacêutica vêm evidenciando a necessidade de mudança nas metodologias de análises microbiológicas, ainda mais em fabricações de biofármacos onde há impossibilidade de esterilização final em autoclave dos lotes produzidos. Frente a isso o teste de esterilidade, aplicado em substâncias, preparações e artigos para uso estéril, permite verificar se estes se encontram livres de contaminação microbiológica pela incubação do produto, ou parte deste, num meio nutritivo. Publicado pela primeira vez na *British Pharmacopoeia* em 1932, desde então o teste de esterilidade é um dos mais importantes testes de avaliação microbiológica. Inicialmente era apenas utilizado um método, o direto, tendo em 1957 sido introduzido também o método de filtração por membrana (indireto) (SANDLE, 2011).

Atualmente, a quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza a execução do teste de esterilidade nos moldes do teste harmonizado nas farmacopeias americana, europeia e japonesa e requer um período de incubação de 14 dias para método direto e indireto. No contexto da produção de medicamentos e seus insumos é de fundamental importância o controle da contaminação para que essa não afete a qualidade do produto e principalmente, a segurança do paciente, uma vez que produtos que contém contaminantes microbiológicos nem sempre apresentam alterações sensoriais evidentes (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Dessa maneira, o risco associado que o produto apresenta depende de fatores intrínsecos como o tipo de consumidor final (crianças, idosos), o estado em que se encontra seu sistema imunológico; o uso pretendido e o grau de exposição e do tecido exposto. (BRASIL, 2010). O Quadro 2 compara dois diferentes métodos para o teste de esterilidade.

O método rápido Bact/Alert 3D se baseia na determinação do crescimento microbiano, que é feita por meio de detecção de alteração da cor de um sensor sensível à liberação de dióxido de carbono produzido por metabolismo microbiano. Ele está entre os métodos alternativos ao teste de esterilidade compendial, conforme descrito na Farmacopeia Europeia 5.1.6 Métodos alternativos para controle de qualidade microbiológica. Na seção de métodos baseados em crescimento e detecção rápida de crescimento, a nomeação 2-1-1-3 métodos de ponto na detecção de crescimento é o consumo ou produção de gás, no caso do BactAlert (BRAZ, 2010; BIOMÉRIEUX, 2018).

Esse método rápido apresenta uma alternativa para o controle de esterilidade em biofármacos a base de proteínas, linhagens celulares, principalmente pela automatização de leitura de resultado. Se a amostra de teste é micro-gerada em dióxido de carbono, os organismos vão metabolizar os substratos do meio de cultura. Quando o crescimento de microrganismos produz CO<sub>2</sub>, a cor deste sensor na parte inferior de cada cultura muda de uma cor escura para uma cor mais clara. O sistema de detecção fornece parâmetros objetivos, que não são afetados pela turbidez da amostra. A amostragem não é destrutiva. Entre as vantagens dessa tecnologia estão: a manipulação mínima da amostra; confiabilidade das leituras por controle automático de qualidade e interpretação de resultados; frascos com etiquetas permitindo identificação de amostras garantindo assim rastreabilidade; menos interferência de turbidez na leitura



comparado os métodos tradicionais da farmacopeia; e para finalizar a vantagem mais importante de resultados rápidos com leitura continuada e notificação imediata de amostras positivas, no máximo 7 dias versus 14 dias do teste de esterilidade tradicional de acordo com a farmacopeia Europeia. A taxa na qual o CO<sub>2</sub> é detectado depende da concentração inicial de microrganismo, por exemplo, uma concentração inicial maior fornecerá uma resposta de detecção mais rápida. No entanto, o nível de sensibilidade requerido para produzir esta resposta (isso é, uma mudança de cor no sensor) não é conhecido. Atualmente, algumas empresas receberam aprovação apenas do FDA para usar métodos microbiológicos rápidos de detecção de CO<sub>2</sub> para testes de esterilidade em produtos baseados em células e tecidos. Para uma empresa, o teste de esterilidade de 14 dias foi reduzido para até apenas três dias. Ou seja, ao comparar as metodologias a absurda principal diferença entre os métodos antigos e novos está no tempo de resultado de análise (WEINSTEIN,1995; MILLER,2011).

**Quadro 2 – Comparação de métodos de Teste de Esterilidade.**

Parâmetros Comparativos	BacT/Alert 3D (Biomérieux®)	Teste de Esterilidade Farmacopeia
Tipo do método	Rápido	Convencional
Eficácia	Qualitativo	Qualitativo
Tempo	24 horas até 7 dias	14 dias
Demanda	Muito alta	Alta
Otimização de recursos	Sim	Não
Precauções	Temperatura de incubação: 32,5 ± 0,5 °C	Temperatura de incubação: 32,5 ± 0,5 °C
Considerações gerais	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método colorimétrico</li> <li>- Se baseia na detecção do crescimento microbiano, feita por meio de detecção de alteração da cor de um sensor sensível à liberação de dióxido de carbono produzido por metabolismo microbiano;</li> <li>- Resultado em um menor tempo (mais rápido); menor tempo de detecção em comparação ao método convencional;</li> <li>- Manipulação mínima da amostra; maior sensibilidade de detecção; maior rastreabilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método direto: inoculação de quantidades/volumes pré-estabelecidos da amostra em volumes estipulados de meios de cultura na forma líquida com comprovada capacidade promotora de crescimento;</li> <li>- Método indireto: filtração da amostra em membrana filtrante e inoculação da membrana em meio de cultura, os meios devem ser estéreis e com comprovada capacidade promotora de crescimento;</li> <li>- Maior manipulação das amostras</li> <li>- Muito tempo para análise de resultado</li> </ul>
Referências	BRAZ, 2010; BIOMÉRIEUX, 2018	5.5.3.2 Farmacopeia Brasileira Volume 1 5ª Edição

Fonte: Próprio autor

Nesse contexto, mais um teste de relevância para a microbiologia é o teste de endotoxinas bacterianas. Hoje, os métodos amplamente utilizados para detecção de endotoxinas empregam o Lisado de Amebócitos *Limulus* (LAL), que é isolado do sangue do caranguejo-ferradura (*Limulus polyphemus*). Muitos laboratórios utilizam instrumentos de bancada para esse tipo de teste, que exigem que as amostras sejam transferidas do chão de fábrica ou de outros locais para o laboratório. Uma publicação recente descreveu o uso de um sistema de teste rápido portátil de endotoxina para análise de amostras biofarmacêuticas, como matérias primas e produtos acabados com resultados em até 15 minutos. Uma dessas tecnologias baseada em LAL utiliza

de um cartucho descartável e um espectrofotômetro de incubação portátil para permitir um método cromogênico cinético quantitativo, medindo a intensidade de cor diretamente relacionado a concentração de endotoxina em uma amostra de teste. Cada cartucho, contém reagente LAL, substrato cromogênico e endotoxina padrão de controle (MILLER, 2011).

A endotoxina é um tipo de pirogênio, agentes causadores de febre, e é um componente da parede celular externa de bactérias Gram-negativas, como a *E. coli* por exemplo. A endotoxina é um lipopolissacarídeo ou LPS. Devido às graves consequências de uma infecção, os medicamentos estéreis, injetáveis devem ser verificados quanto a esse agente (MILLER, 2010). A *Charles River Laboratories* é responsável pelo desenvolvimento do *Endosafe® nexgen-PTS™*. Esta tecnologia de cartuchos, licenciada pela FDA, usa 20 vezes menos matéria-prima do que os testes LAL tradicionais, o que reduz significativamente a quantidade de LAL por teste e minimiza a necessidade de novos testes que são frequentemente necessários com os métodos tradicionais, respeitando os requisitos regulamentares aprovados (CRL, 2007).

**Quadro 3 - Comparação de métodos de Teste de endotoxinas bacterianas.**

Parâmetros Comparativos	Endosafe	Endotoxina bacteriana Farmacopeia
Tipo do método	Rápido	Convencional
Eficácia	Quantitativo	Quantitativo
Tempo	15 minutos	2 horas
Demanda	Muito alta	Alta
Otimização de recursos	Sim	Não
Precauções	37 ±1 °C	37 ±1 °C
Considerações gerais	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sistema rápido e portátil por meio de tecnologia de cartucho</li> <li>- Usa 20 vezes menos matéria-prima do que os testes LAL tradicionais</li> <li>- Cada amostra deve ser diluída na razão 1:60 em água reagente para LAL</li> <li>- Sensibilidade de 0,01-1,0 e 0,05-5,0 EU por mL</li> <li>- Fácil leitura do resultado</li> <li>- Não é necessário fazer a curva de calibração</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método de coagulação em gel: baseado na formação de coágulo ou gel (método semi-quantitativo)</li> <li>- Método turbidimétrico: baseado no desenvolvimento de turbidez após quebra de um substrato endógeno;</li> <li>- Método cromogênico: baseado no desenvolvimento de cor após quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno</li> <li>- O procedimento inclui incubação da endotoxina padrão para obtenção de uma curva de calibração e das soluções controle com reagente LAL, por tempo pré-determinado e leitura espectrofotométrica no comprimento de onda adequado. No caso do procedimento do método turbidimétrico, a leitura é feita imediatamente após período final de incubação, e para o procedimento colorimétrico a reação enzimática é interrompida no final do tempo pré-determinado pela adição do reagente, antes das leituras. Para os procedimentos cinéticos turbidimétricos e colorimétricos os valores de absorvância medida durante o período da reação e valores de velocidades são determinados para aquelas leituras</li> <li>- Demora na leitura do resultado</li> </ul>
Referências	<i>Endosafe Cartridge Technology Brochure</i> – Charles River.	<i>United States Pharmacopeia (USP) Chapter &lt;85&gt; Bacterial Endotoxins Test, 2 USP Chapter &lt;161&gt; Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices.</i>

Fonte: Próprio autor

Por conseguinte, o teste de endotoxina tornou-se um teste de liberação padrão para produtos celulares e de terapia gênica que são fabricados utilizando cultura ou manipulação *in vitro*, e para certos produtos não homólogos que devem ser administrados sem criopreservação. O nível máximo aceitável de endotoxina nestes produtos são geralmente 5,0 unidades de endotoxina (EU)/Kg/dose. Em pesquisas desenvolvidas recentemente, o sistema *Endosafe* forneceu resultados confiáveis com produtos tipicamente produzidos em instalações de fabricação de terapia celular, e seria um teste apropriado para basear a liberação desses produtos que são sensíveis ao tempo (MONDORO, 2005).

Entretanto, o maior entrave para implementação efetiva dos métodos microbiológicos rápidos está na validação, que é um elemento importante para a realização de qualquer nova tecnologia no cenário farmacêutico. O caminho apropriado para submissões rápidas de microbiologia para o FDA é melhor determinado através do diálogo direto com a Agência. Por exemplo, a iniciativa PAT recomenda a discussão com o FDA em relação a todos os aspectos de implementação de novos métodos analíticos de processo, e isso também se aplica aos MRMs (métodos rápidos microbiológicos) (LLOYD, 2006).

Existem orientações atualmente disponíveis sobre validação de métodos rápidos que podem servir de ponto de partida para discussões com o FDA. Algumas dessas orientações incluem o recentemente revisado PDA *Technical Report* nº33 (2013), e as versões atuais do *USP Capítulo 1223 e Ph. Eur. Capítulo 5.1.6*. No entanto, uma empresa também pode desenvolver sua própria estratégia de validação, desde que seja cientificamente sólida e defensável. Cada um desses documentos mencionados, descrevem os princípios básicos para validação, incluindo parâmetros e critérios de aceitação. Alguns parâmetros podem ainda ser mais adequados serem executados pelo próprio fornecedor do método rápido. Contudo, o fornecedor pode também disponibilizar dados adicionais de teste de validação, que podem ser encaminhados diretamente ao usuário final ou os dados podem ser enviados ao FDA na forma de um DMF (*Drug Master File*), que nada mais é do que uma submissão ao FDA para fornecer informações confidenciais detalhadas sobre instalações, processos ou artigos usados na fabricação, processamento de um ou mais medicamentos humanos. Se a DMF de um fornecedor tiver sido enviada, o usuário final terá, em muitos casos, apenas que fornecer dados de testes não cobertos na DMF, bem como dados específicos do produto associados à qualificação do método rápido (MILLER, 2019).

Além do mais, outra opção para gerenciar a validação de método rápido é o Protocolo de Comparabilidade (PC) com um plano bem definido, detalhado e escrito para avaliar o efeito de mudanças específicas nas análises de identidade, força, pureza, potência, entre outras de um medicamento específico, afinal fatores relacionados à segurança e à eficácia do produto estão envolvidos. O PC é um protocolo elaborado para demonstrar que o método novo é adequado ao uso pretendido, além de ser revisado pelo FDA facilitando assim a comunicação com a agência. Desse modo, no início de 2011 a EMA introduziu mudanças significativas no gerenciamento de revisões de métodos rápidos que tornaram o processo de validação e aprovação muito mais previsível e alinhado aos processos que estavam em uso pelo FDA. O novo processo que é muito semelhante ao protocolo de comparabilidade do FDA, é chamado de PACMP (*Post Approval Change Management Protocol*) (MILLER, 2019).

Por isso deve ser notado que várias empresas já utilizaram estas mesmas estratégias para as aprovações dos métodos rápidos, principalmente aqueles associados aos medicamentos vendidos nos EUA. É altamente recomendável a discussão da mudança proposta com os órgãos regulatórios no início do processo de implementação, pois a introdução dos métodos rápidos

pode ser mais bem gerenciada por meio de programa interno de controle de mudança da empresa, colaborando também para a avaliação do impacto financeiro na inserção dessas novas tecnologias. Conseqüentemente, em termos de adequação aos produtos e instalações toda incorporação de método microbiológico rápido deve ser avaliada antes de ser implementada, visto que se a empresa seguir um modelo financeiro que projeta o Valor Presente Líquido e o Período de *Payback* associados ao investimento em conformidade, é provável que haja um impacto significativo na redução de estoques e dos requisitos de capital de giro, juntamente os custos seriam reduzidos quando associados a identificação antecipada de eventos de contaminação quando eles ocorrem. Ou seja, tempo é dinheiro, quanto mais rápida a resposta de uma análise menos dinheiro é perdido. Logo, a forma mais adequada de melhorar a eficiência na fabricação de medicamentos é menos tempo de fabricação (LLOYD, 2006).

Mas ainda muitos dos novos produtos resultantes da biotecnologia nos últimos 20 anos foram estéreis. Principalmente medicamentos à base de proteína e assim o uso de calor úmido ou seco, ou irradiação é excluído devido a danos significativos na estrutura molecular, que é inerente a atividade biológica. Pesquisas apontam para a ascensão nos produtos biofarmacêuticos à medida que nossa compreensão da doença em nível molecular aumenta e nossa capacidade de manipular as linhas celulares melhora. O potencial para terapia com células-tronco está apenas sendo realizado, mas o que permite que esses biofármacos sejam administrados e tenham ação no local alvo é que sejam produzidos assepticamente. Nesse caso, a implementação dos métodos microbiológicos na indústria farmacêutica é fundamental para otimização de tempo de resultado e controle de processo produtivo, além da regulamentação pelas agências regulamentadoras nos países em que esses medicamentos biotecnológicos são produzidos, como o Brasil.

Em suma, os métodos microbiológicos rápidos são mais vantajosos principalmente no que se refere ao tempo de resultado, uma vez que as análises microbiológicas demoram muito para apresentar um resultado conclusivo, sendo assim, ao aplicar o uso de métodos rápidos os custos podem ser reduzidos quando associados a identificação antecipada de eventos de contaminação, quando eles ocorrem. Além do que, os MMR apresentam maior confiabilidade, especificidade elevada, reduzem o número de etapas de trabalho, diminuem o erro analítico, e conseqüentemente o tempo de ciclos de produção é reduzido. Após a comparação dos métodos foi possível identificar que o tempo de resultado das novas tecnologias é muito mais rápido quando comparado aos métodos tradicionais.

## CONCLUSÃO

Diante disso, o desafio está presente. O papel do microbiologista, bem como do farmacêutico nas avaliações de risco, dados, opiniões e no apoio às novas tecnologias de metodologias rápidas de análises frente a uma demanda de biofármacos que apresentam um prazo de validade mais curto, e necessitam de uma liberação de análises microbiológicas mais rápida, para um consumo mais imediato é fundamental na garantia da redução do risco ao paciente.

Afinal, as análises microbiológicas são as que levam mais tempo para liberação de um lote na indústria farmacêutica, por isso o comparativo entre as metodologias tradicionais e as novas tecnologias exposto nesse trabalho evidencia as vantagens dos métodos microbiológicos rápidos em termos de rapidez, resolução, sensibilidade e automação. Assim, o processo de implementação e aprovação regulamentar dos métodos rápidos é trabalhoso, visto a demanda de trabalho para um processo de validação robusto, sendo então, imprescindível o contato com

as agências regulamentadoras para um controle cada vez mais sensível, assertivo e rápido, essencialmente para produtos biotecnológicos provenientes por exemplo, de terapia celular.

## REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Guia de Microbiologia: Controle microbiológico na indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos.** São Paulo: PDS/HPPC, 2015. 107 p.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 17**, de 16 de Abril de 2010. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 29 mai. 2018.
- BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira, volume 1.** 5ª Ed. Brasília, 2010.
- ASSIS, Diego M.; JULIANO, Luiz & JULIANO, Maria A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microrganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p.344-355, dez. 2011.
- BioMérieux. **Gama de fitas API®.** Disponível em: <<https://www.biomerieux.com.br/produto/gama-de-fitas-apir>>. Acesso em 21 abr. 2018.
- BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC Nº 481**, 23 de setembro de 1999. Estabelece os Parâmetros de Controle Microbiológico para os Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfume. Brasília, 1999.
- BRASIL. CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Relatório nº49** - Proposta de incorporação do xpert mtb/rif como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à rifampicina. Nov. 2014.
- BRAZ, Ana Inês de Matos Domingos. **Comparação de métodos de identificação de bactérias floculentas presentes em ETAR.** 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.
- BRUM, Mário Celso S.; WEIBLEN, Rudi. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, Eduardo Furtado. **Virologia veterinária.** Santa Maria: Editora Ufsm, 2007. Cap. 3. p. 59-86.
- CÂNDIDO, Alexandre Luna; TUNON, Gabriel Isaias Lee; CARNEIRO, Maria Regina Pires. Métodos de diagnóstico microbiológico. In: CÂNDIDO, Alexandre Luna; TUNON, Gabriel Isaias Lee; CARNEIRO, Maria Regina Pires. **Microbiologia Geral.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe: Cesad, 2010. Cap. 10. p. 173-192.
- Chapter <71>, Sterility Tests, USP 26, USPC, Inc., Rockville, MD, p. 2011 (2003) Disponível em:<<http://www.usp.org/>> Acesso em:14 Jun 2018.

Charles River Laboratories. Disponível em <<https://www.criver.com/products-services/qc-microbial-solutions/endotoxin-testing/endotoxin-testing-systems/endosafe-nexgen-mcs?region=3621>> Acesso em: 20 maio 2019

**Draft Guidance for Industry, PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance**, FDA (2003). Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2018.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Transdermal drug**. Disponível em:<<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/022699.txt>>. Acesso em: 29 maio 2018.

FERNANDES, Henrique Pereira. **Avaliação microbiológica da qualidade do ar no interior da biblioteca central do campus da universidade federal de Juiz de Fora**. 2014. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Sanitarista e Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

GREEN, Stewart. Director of Quality, Wyeth, UK and Chair, Pharming. **European Pharmaceutical Review** 3 January 2008

GOVERDE, Dr. Marcel . **Current Rapid Micro Methods (RMMs) for Environmental Monitoring, Validation, and Real-Time Viable Particle Detection**. European Pharmaceutical Review, 19 11 2013. Disponível em: <<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/webinar/19704/pharma-webinar-current-rapid-micro-methods-rmms-for-environmental-monitoring-validation-and-real-time-viable-particle-detection/>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

JOSHUA , H. et al. **Jornal de Microbiologia Clínica**, p. 2800-2804, 8. 2008.

LEOTTA, Gerardo. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. **Revista Argentina Microbiologica**. Buenos Aires , v. 41, n. 2, 2009.

LIMA, Taiza Maschio de; BELOTTI, Naiara Cristina Ule; NARDI, Susilene Maria Tonelli e PEDRO, Heloisa da Silveira Paro. **GeneXpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis**. Revista Pan-Amazônica de Saúde. Ananindeua, v. 8, n. 2, p. 65-76, 06 2017. Disponível em: <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2176-62232017000200065&lng=pt&nrm=iss&tlng=en](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2176-62232017000200065&lng=pt&nrm=iss&tlng=en)>. Acesso em: 14 mai. 2018.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel, H. & STAHL, David, A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MILLER, Michael J. **Towards the real application of rapid microbiological methods in developing countries**. European Pharmaceutical Review, 22 10 2013. Disponível em:<<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/22274/towards-real-application-rapid-microbiological-methods-developing-countries/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

MILLER, Dr Michael J. World Courier ARTICLE **The regulatory acceptance of rapid microbiological methods**. European Pharmaceutical Review, v. 22, 29 06 2017. Disponível

---

em:<<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/62880/rapid-microbiological-methods-regulatory-acceptance/>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

MURDOCH, Dr Lynn. **Rapid testing methods: the cost-effective safety solution**. European Pharmaceutical Review, v. 6, 04 01 2018. Disponível em:<<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/71113/rapid-testing-methods-the-cost-effective-safety-solution/>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

O'HARA, Steve. European Pharmaceutical Review. **Recent development in Rapid Microbiology Methods**. 29 nov. 2008. Disponível em:<<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/1475/recent-development-in-rapid-microbiology-methods/>>. Acesso em: 16 jun. 2018.

OGUNLEYE, Adewale Joseph . **Emerging trends in microbiological diagnostics: an introduction to rapid microbiological methods**. European Pharmaceutical Review. Nigeria, 29 01 2016. Adekunle Ajasin Universit. Disponível em:<<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/38382/an-introduction-to-rmms/>>. Acesso em: 01 mai. 2018

PARILLO, J. E. **Pathogenic Mechanisms of septic shock**. Journal of Medicine. 1993. England.

SANDLE, T. (2011). Sterility Test Requirements for Biological Products. **Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter** – Vol. 17, Nº 8.

SUTTON, Scott. Microbial Surface Monitoring. *In*: DIXON, Anne Marie. **Environmental Monitoring for Cleanrooms and Controlled Environments**. Vol. 161. New York: Informa Healthcare, 2007. Cap. 5. p. 73-92.

Validation of Alternative Microbiological Methods. United States Pharmacopeial Convention. US Pharmacopeia. Capítulo <1223>. 2016. Disponível em:<[http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0\\_c1223.html](http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1223.html)> Acesso em: 10 jun. 2018.

WOODCOOK, Janet (2004) **The Concept of Pharmaceutical Quality**. American Pharmaceutical Review. Disponível em: <<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/1505-Issue-Archives/>> Acesso em: 10 mai. 2018

Publicado em 18/04/2022