

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM
INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA DA LITERATURA**

**IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS FUNGI IN
PHARMACEUTICAL INDUSTRIES: AN INTEGRATIVE
LITERATURE REVIEW**

**IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS EN
INDUSTRIAS FARMACÉUTICAS: UNA REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA INTEGRADORA**

Filipe Mercês MOREIRA

Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2635-2066>
E-mail: filipe.moreira@bio.fiocruz.br

Rebeca Vitória da Silva LAGE

Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7131-6155>,
E-mail: rebeca.lagee@gmail.com

Luciana Veloso da COSTA

Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1873-4056> ,
E-mail: luciana.costa@bio.fiocruz.br

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO

Laboratório de Controle Microbiológico, Bio-Manguinhos/Fiocruz, RJ, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1121-7312>,
E-mail: marcelo.brandao@fiocruz.br

RESUMO:

Os fungos são microrganismos que podem representar risco durante a produção de medicamentos nas indústrias farmacêuticas. A correta identificação desses contaminantes é de grande importância para auxiliar na análise de riscos e na tomada de ações preventivas e corretivas durante a cadeia produtiva. O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão integrativa da literatura referente à ocorrência de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas e das metodologias utilizadas para sua identificação. Os gêneros mais ocorrentes identificados foram: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo relatados em trabalhos de três países. As metodologias de identificação encontradas foram: métodos morfológicos (avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos), caracterização fenotípica, análise proteômica por MALDI-TOF MS e análise de sequências de DNA das regiões ITS e D1/D2 do DNA ribossomal. Poucos estudos relativos à identificação de fungos filamentosos e a sua diversidade em indústrias farmacêuticas foram identificados na literatura consultada, indicando que este tema precisa ser mais explorado.

Palavras-Chave: Fungos filamentosos. Indústria farmacêutica. Identificação de contaminantes.

RESUMEN:

Los hongos son microorganismos que pueden representar un riesgo durante la producción de medicamentos en las industrias farmacéuticas. La correcta identificación de estos contaminantes es de gran importancia para ayudar en el análisis de riesgos y en la toma de acciones preventivas y correctivas durante la cadena de producción. El objetivo de este estudio fue realizar una revisión integradora de la literatura sobre la ocurrencia de hongos filamentosos en las industrias farmacéuticas y las metodologías utilizadas para su identificación. Los géneros más comunes identificados fueron: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Fusarium*, siendo reportados en estudios de tres países. Las metodologías de identificación encontradas fueron: métodos morfológicos (evaluación de aspectos macroscópicos y microscópicos), caracterización fenotípica, análisis proteómico por MALDI-TOF MS y análisis de secuencias de DNA de las regiones ITS y D1 / D2 del DNA ribosómico. En la literatura consultada se identificaron pocos estudios sobre la identificación de hongos filamentosos y su diversidad en las industrias farmacéuticas, lo que indica que este tema necesita ser explorado más a fondo.

Palavras Clave: Hongos filamentosos. Industria farmacéutica. Identificación de contaminantes.

ABSTRACT:

Fungi are microorganisms that can represent a high risk during the production of drugs in pharmaceutical industries. The correct identification of this contaminant has a great importance to assist in risk analysis and in taking preventive and corrective actions during the production chain. The aim of this study was to accomplish an integrative literature review regarding the occurrence of filamentous fungi in pharmaceutical industries and the methodologies used for their identification. The most common genera identified were: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Fusarium*, being reported in studies from three countries. The identification methodologies found were: morphological methods (evaluation of macroscopic and microscopic aspects), phenotypic characterization, proteomic analysis by MALDI-TOF MS and analysis of DNA sequences from the ITS and D1/D2 regions of the ribosomal DNA. Few studies related to the identification of filamentous fungi and their diversity in pharmaceutical industries were identified in the consulted literature, indicating that this topic needs to be further explored.

Keywords: Filamentous fungi. Pharmaceutical industry. Identification of contaminants.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos em uma indústria farmacêutica exige o cumprimento de ações regulatórias que envolvam todas as etapas do processo produtivo, desde a matéria prima, instalações e equipamentos, até o treinamento e higiene pessoal dos funcionários (WHO, 2011). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é o órgão com autonomia jurídica responsável pela regulamentação, controle e fiscalização dos produtos, garantindo a segurança e zelando pela qualidade de vida da população (BRASIL, 1999).

As diretrizes que visam reduzir os riscos inerentes à produção farmacêutica e garantir os requisitos básicos para controle dos padrões de qualidade são determinadas pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 301/2019, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Medicamentos. Os principais riscos abordados pelas BPF referem-se à contaminação de natureza química ou microbiológica, contaminação cruzada e troca ou mistura de insumos (BRASIL, 2019b).

Os fungos estão entre os principais grupos de microrganismos que podem ser encontrados em áreas de produção farmacêutica. A contaminação fúngica pode alterar as características de produtos farmacêuticos, tanto devido à metabolização de compostos e/ou produção de substâncias que podem alterar sua composição ou estabilidade (SANDLE, 2021).

Além disso, determinados gêneros e espécies são produtores de micotoxinas (PITT & MILLER, 2017), que podem representar um perigo para a saúde do paciente, caso estas não sejam eliminadas ou reduzidas a níveis aceitáveis, ao longo da cadeia produtiva (BAIN et al., 2015). O risco de contaminação requer que os processos produtivos sejam realizados em áreas com condições ambientais e de limpeza controladas como forma de minimizar a introdução, geração e retenção de contaminantes em seu interior. Essas áreas são projetadas minuciosamente para a redução das fontes de contaminação, levando em consideração o fluxo de pessoal e material, sistema de tratamento de ar, utilidades e qualificação de operadores (FDA, 2004; WHO, 2011; EMA, 2020; ISO, 2015; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

O Controle de Qualidade (CQ) é parte essencial para garantia das BPF na produção farmacêutica. O CQ tem como atribuições a coleta de amostras, a definição de especificações, a execução de ensaios, e a confecção da documentação e procedimentos de liberação, de modo a assegurar que os ensaios relevantes e necessários sejam

executados e que os materiais e produtos não sejam liberados para uso e/ou comercialização ou distribuição, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória (BRASIL, 2019b). Como parte dessas atividades, se encontra o controle microbiológico, que exerce um papel fundamental no monitoramento da biocarga dos ambientes controlados, operadores, insumos, produtos intermediários e finais.

As agências regulatórias exigem que produtos e insumos farmacêuticos de todos os tipos sejam adequadamente controlados em relação ao potencial de contaminação microbiana, sendo essa questão cada vez mais estudada e aprimorada dentro das BPF (EMA, 2020).

As agências reguladoras estabelecem a necessidade de investigação, e de medidas que auxiliem no controle de contaminantes microbianos, principalmente quando se excede o nível recomendado de alerta e ação (BRASIL, 2019b; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; USP, 2021). De acordo com a Farmacopeia Americana (USP, 2021), a identificação microbiana é necessária em processos assépticos, sendo exigida em testes positivos de esterilidade e na avaliação de contaminantes recuperados em processos de simulação asséptica.

Diferentes tipos de microrganismos são encontrados em uma área industrial, principalmente bactérias e fungos, e o conhecimento sobre a microbiota é fundamental na avaliação do perfil e rastreabilidade dos contaminantes (COSTA et al., 2021a; LAGE et al, 2021; VASCONCELOS et al, 2021).

Os fungos são organismos eucariotos pertencentes ao reino Fungi, que alberga tanto microrganismos unicelulares (leveduras) quanto multicelulares (fungos filamentosos), e sua identificação até o nível de espécie ainda é um desafio, devido à escassez de estudos taxonômicos quando comparado aos trabalhos envolvendo espécies bacterianas. Os fungos filamentosos podem contaminar diversas áreas devido à facilidade de dispersão dos esporos e à possibilidade de crescimento em diferentes tipos de substrato (SANDLE, 2021). A identificação desses microrganismos, quando provenientes de ambientes de produção farmacêutica, se torna necessária para a elaboração de estratégias para redução de perdas na produtividade, desvios da qualidade, e reprovação de lotes, além da melhora do tempo de resposta em planos de ações (LEITE et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão integrativa da literatura sobre as metodologias e a prevalência de espécies de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas.

2 METODOLOGIA

A pesquisa bibliográfica foi realizada a partir da análise de documentos que abordassem o tema escolhido para estudo no período de 2000 até 2021, nos idiomas português e inglês.

Foram consultadas farmacopeias nacionais e internacionais, publicações das Agências de Saúde Nacionais e Internacionais, instituições reconhecidas na área de qualidade de produtos imunobiológicos, associações, bases de dados e na Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) pela interface do Portal Capes (Quadro 1).

As palavras utilizadas como estratégia de busca foram: indústria farmacêutica, fungos filamentosos, fungos, indústria de medicamentos, medicamentos, área limpa, sala limpa, biocarga, contaminação microbiana. Foram incluídos artigos completos disponíveis, resumos, teses, dissertações e trabalhos em anais de congressos.

Quadro 1 – Fontes de pesquisa bibliográfica.

Pesquisa Bibliográfica	Fonte de Consulta
Farmacopeias nacionais e internacionais	Farmacopeia Brasileira (6ª edição) <i>The United States Pharmacopeia (USP)</i>
Agências de Saúde Nacionais e Internacionais	<i>World Health Organization (WHO)</i> Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) <i>International Organization for Standardization (ISO)</i> <i>Food and Drug Administration (FDA)</i> <i>European Medicines Agency (EMA)</i>
Instituições	<i>Parenteral Drug Association (PDA)</i> Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-manguinhos) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)
Bases de dados	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i> <i>Scientific Electronic Library Online (SCIELO)</i>

Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS)	Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) <i>Scopus</i> <i>Web of Science</i>
---	---

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ocorrência de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas

Na Tabela 1, estão apresentados os principais gêneros de fungos filamentosos identificados na literatura consultada. Os gêneros mais ocorrentes foram: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Os fungos isolados em salas limpas de indústrias farmacêuticas podem ser originários de diferentes fontes, incluindo o corpo humano e/ou animal, áreas internas e externas, demonstrando a importância de um robusto programa de monitoramento que contemple os procedimentos de paramentação, monitoramento ambiental e disciplina comportamental em áreas controladas (COSTA et al, 2021a).

No Brasil, foram identificadas apenas três publicações na literatura consultada (Tabela 1). No trabalho realizado por Utescher e colaboradores (2007), o gênero *Penicillium* representou 84,58% das 201 cepas identificadas no programa de monitoramento ambiental de áreas classificadas do Instituto Butantan; enquanto no trabalho realizado por Cruz (2015), os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* representaram 95,05% das 385 cepas isoladas a partir de amostras de monitoramento ambiental, monitoramento de água, validação e testes de esterilidade do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

A pesquisa de Leite e colaboradores (2020), realizada em uma indústria farmacêutica localizada em Minas Gerais, identificou 12 espécies de fungos filamentosos de amostras provenientes de monitoramento ambiental e superfícies de áreas controladas, sendo as maiores ocorrências dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (55,55%).

Tabela 1 – Gêneros de fungos filamentosos presentes em áreas limpas, suas possíveis origens e ocorrência na indústria farmacêutica.

Gênero	Nicho primário	Possíveis origens	Referências	Ocorrência em estudos	País	Autores
<i>Aspergillus</i>	Solo, vegetais e alimentos. Paredes úmidas (como mofo), áreas quentes (por exemplo, banheiros). Cresce em condições de poucos nutrientes	Ambiente interno e externo: ar, superfícies, paredes, pisos e água	SALES, 2009; MAGRINE et al., 2011; PITT & MILLER, 2017; ANDRADE JÚNIOR et al., 2019; BEN TAHEUR et al., 2019; KOEHLER et al., 2021; YUNES et al., 2020; SANDLE, 2021 VIJAYAKUMAR et al., 2015	n=95 (51.40%)	Índia	VIJAYAKUMAR, 2015
				n=136 (35.32%)	Brasil	CRUZ, 2015
				n=3 (33.33%)	Brasil	LEITE et al., 2020
				n=10 (8.62%)	Inglaterra	SANDLE, 2021
				n=8 (3.98%)	Brasil	UTESCHER et al., 2007
<i>Cladosporium</i>	Material vegetal vivo e morto, abundante no ar externo, encontrado em edifícios úmidos	Ambiente interno e externo: ar, superfícies, paredes, pisos e água	BATRA et al., 2019; SANDLE, 2021; VIJAYAKUMAR et al., 2015	n=108 (28.05%)	Brasil	CRUZ, 2015
				n=51 (27.57%)	Índia	VIJAYAKUMAR, 2015
				n=30 (25.86%)	Inglaterra	SANDLE, 2021
				n=12 (5.97%)	Brasil	UTESCHER et al., 2007
<i>Fusarium</i>	Solo, vegetais e alimentos	Ambiente externo: ar e superfícies	PITT & MILLER, 2017; SANDLE, 2021; VIJAYAKUMAR et al., 2015	n=24 (20,68%)	Inglaterra	SANDLE, 2021
				n=95 (51.40%)	Índia	VIJAYAKUMAR, 2015
				n=4 (1.99%)	Brasil	UTESCHER et al., 2007
				n=4 (1.04%)	Brasil	CRUZ, 2015
<i>Penicillium</i>	Solo, vegetação, ar, poeira e alimentos. Cresce preferencialmente em locais com climas frios e moderados	Ambiente interno e externo: ar, superfícies, paredes, pisos e água	PITT & MILLER, 2017; SANDLE, 2021; VIJAYAKUMAR et al., 2015	n=170 (84.58%)	Brasil	UTESCHER et al., 2007
				n=95 (51.40%)	Índia	VIJAYAKUMAR, 2015
				n=122 (31.68%)	Brasil	CRUZ, 2015
				n=32 (27,58%)	Inglaterra	SANDLE, 2021
				n=2 (22.22%)	Brasil	LEITE et al., 2020

3.2 Métodos de identificação de fungos filamentosos

A identificação de fungos filamentosos, tradicionalmente, é realizada através de procedimentos fenotípicos (análise do perfil metabólico) associado à avaliação dos aspectos macroscópicos e microscópicos das colônias (VIJAYAKUMAR et al, 2012). Contudo, essas metodologias são demoradas, muitas vezes subjetivas, e requerem expertise dos microbiologistas. Dessa forma, métodos automatizados e rápidos têm sido desenvolvidos e avaliados para atender a demanda desta área (LEITE et al, 2020).

A identificação de fungos filamentosos na micologia é tradicionalmente baseada em: 1) caracterização da cultura (morfologia da colônia, coloração, tamanho e produção de pigmentos); 2) caracterização morfológica (morfologia celular, tamanho da célula e técnicas de coloração (ex.: Gram, azul de algodão, entre outras); 3) caracterização fisiológica (tolerância ao oxigênio e salinidade, pH e temperatura de crescimento); 4) perfil bioquímico (padrão enzimático, oxidação ou fermentação de carboidratos, entre outros); 5) características de inibição (tolerância a sais biliares, suscetibilidade a antibióticos e tolerância a corantes); 6) testes sorológicos (aglutinação) e; 7) aspectos quimiotaxonômico (perfil de ácidos graxos e produção de toxinas) (SUTTON & CUNDELL, 2004).

O método convencionalmente utilizado na identificação de isolados fúngicos em indústrias farmacêuticas baseia-se nas características da cultura e nas estruturas de reprodução. Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, uma estrutura prolongada que dá origem aos conídeos, também chamados de esporos, que são os responsáveis pela reprodução dos fungos. As variações desses elementos entre as espécies, como presença de septo ou não na hifa, cor, arranjo e formação dos conídeos, são utilizadas para a identificação morfológica de fungos filamentosos (PINTO et al., 2012).

Os aspectos biológicos são complexos, pois muitos fungos são nutricionalmente exigentes e/ou de crescimento lento. Além disso, a interpretação dos resultados baseados em observações micro e macroscópicas pode ser subjetiva ou inconclusiva, e requerem tempo e expertise dos analistas (SIMÕES et al., 2013).

Outro fator importante que limita a identificação de fungos morfológicamente é o surgimento comum de espécies crípticas, que são espécies que divergiram recentemente, isto é, ainda são morfológicamente idênticas, mas são diferentes geneticamente (MATUTE et al., 2006; GAUTIER et al., 2016).

Além disso, os microrganismos isolados de amostras ambientais, como áreas limpas farmacêuticas, são submetidos a estresse ambiental, o que gera uma extensa variabilidade fenotípica entre representantes da mesma espécie, podendo provocar resultados equivocados (PINTO et al., 2010). Conseqüentemente, esses métodos requerem técnicas complementares mais robustas para diferenciação e identificação dos isolados. Nos últimos anos, vários métodos baseados em espectrometria de massa (MS) para a identificação de microrganismos foram desenvolvidos (CASSAGNE et al, 2016; HYDE et al, 2016; USP, 2021; LEITE et al, 2020).

A análise do proteoma microbiano pela técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguida pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization - Time of flight*) tem sido frequentemente utilizada na micologia clínica para a identificação rápida de fungos, sendo um passo crucial para determinação da terapia antifúngica que será aplicada ao paciente (DELAVY, 2019).

Já na indústria farmacêutica, o MALDI-TOF MS é utilizado para o controle e monitoramento dos produtos e das áreas produtivas (CASSAGNE et al, 2016; HYDE et al, 2016; KHOT & FARRANCE, 2016; LEITE et al, 2020; USP, 2021).

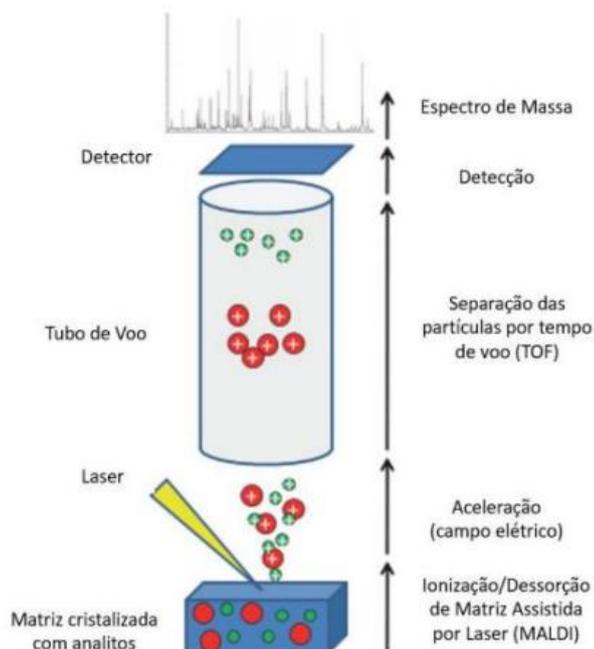
MALDI-TOF MS tem se mostrado uma ferramenta confiável, rápida e precisa na identificação de determinados grupos microbianos (COSTA et al., 2019; MEDEIROS, 2015). Trata-se de método fenotípico e molecular que se baseia na diferenciação de perfis proteicos para a identificação e caracterização de microrganismos (LOONEN et al., 2012; VAM VEEN;2010).

Para a identificação do microrganismo por esse método, a amostra preparada é bombardeada por feixes de laser ultravioleta (UV) em um determinado comprimento de onda, o que promove a ionização das proteínas presentes por excitação.

Após essa etapa, uma matriz é adicionada à amostra e absorve a energia do laser, promovendo a ionização e dessorção do analito, de forma que os íons resultantes apresentem carga positiva, mesmo com massas diferentes. Os íons gerados são orientados por meio de um campo elétrico e ejetados através de um tubo de voo até o detector, onde as amostras serão separadas por massa/carga segundo o tempo de voo.

Assim, os íons mais leves alcançam o detector primeiro em relação aos íons mais pesados. Cada partícula ionizada gera um espectro e o conjunto de partículas detectadas é convertido em um perfil de espectros (Figura 1) (CROXATTO et al., 2012).

Figura 1 Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF MS).



Fonte: Adaptado de CROXATTO et al., 2012.

Diferente das bactérias, os fungos possuem células maiores e uma parede celular mais rígida, composta basicamente por glucanos e quitina (GOW et al., 2017). Levando isso em consideração, diversos autores desenvolveram adaptações nos protocolos de preparação de amostras para otimizar a extração de proteínas e melhorar a capacidade de identificação do método, conforme apresentado na Tabela 2.

Leite e colaboradores (2020) utilizaram o MALDI-TOF MS para identificação de fungos isolados a partir de monitoramento ambiental e superfícies de áreas de produção de medicamentos de uma indústria farmacêutica num período de um ano. Todos os isolados de fungos filamentosos foram identificados em nível de gênero, sendo os mais frequentes: *Aspergillus* (33,33%) e *Penicillium* (22,22%).

Apesar dos resultados, apenas 68,42% das linhagens foram identificadas em nível de espécie, sugerindo que o banco de dados comercializado não seria suficiente para identificar espécies fúngicas de origem ambiental (RAHI et al., 2016).

Tabela 2 – Protocolos de preparo de amostras para identificação de fungos filamentosos por MALDI TOF MS.

Gêneros avaliados	Origem	Plataforma	Protocolo proposto	Principais resultados	Referência
<i>Aspergillus</i> (n=136), <i>Penicillium</i> (n=122), <i>Cladosporium</i> (n=108), <i>Curvularia</i> (n=8), <i>Fusarium</i> (n=4), <i>Paecilomyces</i> (n=2), <i>Pitomyces</i> (n=1), <i>Rhinochadiella</i> (n=1), <i>Scopulariopsis</i> (n=1), <i>Trichoderma</i> (n=1), <i>Tritirachium</i> (n=1)	385 isolados da indústria farmacêutica	BioMérieux	1) Extração com ácido Trifluoroacético (TFA), ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), com ou sem pérolas de vidro; 2) Extração TFA, ácido 2,5 dihidroxibenzóico (DHB), com ou sem pérolas de vidro; 3) Extração com maceração e DHB.	Identificou 3,89% (n=15) dos 385 isolados, todas as identificações foram com o uso da metodologia de TFA com CHCA. A utilização de pérolas de vidro não apresentou variação nos resultados.	CRUZ, 2015
<i>Aspergillus</i> (n=3), <i>Penicillium</i> (n=2), <i>Chaetomium</i> (n=1), <i>Moniliella</i> (n=1), <i>Paecilomyces</i> (n=1), <i>Scopulariopsis</i> (n=1)	9 isolados da indústria farmacêutica	Bruker	Extração com etanol 75%, ácido fórmico 70% e acetonitrila	Foi identificado 100% das cepas em nível de gênero e 68,42% em nível de espécie.	LEITE et al., 2020
<i>Aspergillus</i> (n=466), <i>Penicillium</i> (n=77), <i>Scedosporium</i> (n=19), <i>Fusarium</i> (n=16), <i>Alternaria</i> (n=10), <i>Eurotium</i> (n=7), <i>Emericella</i> (n=4), <i>Rhizopus</i> (n=4), <i>Paecilomyces</i> (n=3), <i>Trichoderma</i> (n=3), <i>Tillietopsis</i> (n=2), <i>Brachycladium</i> (n=1), <i>Cladosporium</i> (n=1), <i>Hamigera</i> (n=1), <i>Gibberella</i> (n=1), <i>Acrophialophora</i> (n=1), <i>Epicoccum</i> (n=1), <i>Exophiala</i> (n=1), <i>Phaeoacremonium</i> (n=1), <i>Scopulariopsis</i> (n=1), <i>Lichtheimia</i> (n=1), <i>Mucor</i> (n=1), <i>Fomitopsis</i> (n=1), <i>Geotrichum</i> (n=1), <i>Radulidium</i> (n=1)	625 cepas de origem clínica	Bruker	Extração com ácido fórmico e acetonitrila.	Identificação correta de 556 (89%) das cepas em nível de espécie. Melhora na taxa de identificação em até 61%.	RANQUE et al., 2013
<i>Aspergillus</i> (n=14), <i>Alternaria</i> (n= 9) e <i>Penicillium</i> (n=4)	27 isolados de produtos alimentícios	Bruker	Extração com etanol 75%, ácido fórmico 70% e acetonitrila	Identificou corretamente 88,88% dos isolados (23/27) em nível de espécie.	ELBEHIRY et al., 2017
<i>Aspergillus</i> (n=53), <i>Scedosporium</i> (n=12), <i>Fusarium</i> (n=8), <i>Penicillium</i> (n=7), <i>Irpex</i> (n=4), <i>Cladosporium</i> (n=3), <i>Coccidioides</i> (n=2), <i>Basidiomycete</i> não identificado (n=2), <i>Arthrographis</i> (n=2), <i>Rhizopus</i> (n=2), <i>Verruconis</i> (n=2), <i>Curvularia</i> (n=2), <i>Alternaria</i> (n=1), <i>Scopulariopsis</i> (n=1), <i>Microsporium</i> (n=1), <i>Trichophyton</i> (n=1), <i>Mucor</i> (n=1), <i>Eutypella</i> (n=1), <i>Volvariella</i> (n=1)	106 cepas de origem clínica	Bruker	Extração com TFA 2,5% saturado com CHCA e acetonitrila 50%.	Pontuação de identificação aceitável em nível de gênero ou espécie foi alcançada para até 63,0% dos isolados em comparação aos 52,8% obtido com o protocolo de rotina.	LUETHY et al., 2018

Os softwares atuais para análise de dados de MALDI-TOF MS permitem a inserção de novos espectros para expansão e personalização dos bancos de dados, permitindo um aprimoramento de sua eficácia na identificação de microrganismos (PIERRE et al., 2014; VELOO et al., 2018; PATEL, 2019; COSTA et al., 2021b).

Os espectros adicionados devem ser criados a partir de isolados preparados, dispondo da mesma metodologia utilizada para a sua identificação. Isso porque as proteínas ribossomais utilizadas como biomarcadores para a análise sofrem modificações pós-traducionais específicas que as tornam distinguíveis.

Mudanças na condição de crescimento do microrganismo podem levar a diferentes modificações ribossomais, comprometendo a identificação da espécie (REICH et al., 2013). O banco de dados desenvolvido deve ser validado para atender aos requisitos das agências regulatórias (CFR11, 2003; BRASIL, 2019a). Entretanto, cada fabricante utiliza algoritmos específicos, tornando os dados numéricos gerados muitas vezes não comparáveis entre si (FLAUDROPS, 2017).

Outra limitação do sistema MALDI-TOF MS é que, apesar de muito utilizado, ainda existe uma escassez de dados divulgados na literatura científica relacionados a identificação de fungos filamentosos ambientais em indústrias farmacêuticas, impedindo a comparação de resultados para um melhor entendimento da microbiota de áreas produtivas e avanços no aprimoramento dos métodos de identificação até o nível de espécie (ANDRADE et al., 2018; LEITE et al., 2020). A ausência de um banco de dados público para MALDI, como é o caso de técnicas como o *multilocus sequence typing* (MLST) disponíveis no pubMLST (<https://pubmlst.org/databases/>) e o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para análises de sequências de DNA, também dificulta a comparação e compartilhamento de dados por esta técnica (FLAUDROPS, 2017).

Como alternativa para essas linhagens não identificadas por MALDI-TOF MS, os métodos genotípicos baseados na análise de sequências de ácidos nucleicos têm sido utilizados. Estes são considerados mais sensíveis e específicos que as técnicas bioquímicas tradicionais e outros métodos fenotípicos, tornando-se uma importante ferramenta na identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012).

Os métodos moleculares permitem a análise de polimorfismo em organismos, apresentando a vantagem de serem menos subjetivos por não sofrerem variações em função de fatores ambientais, o que ocorre com os métodos fenotípicos (JOLLEY et al., 2018). A implementação de métodos moleculares na rotina de identificação de fungos em uma indústria farmacêutica necessita que aspectos regulatórios sejam levados em

consideração, incluindo a necessidade de demonstração da aplicabilidade equivalente ou superior aos métodos compendiais e a validação do método no laboratório (CRF11; USP, 2021). Além disso, estas metodologias são mais laboriosas e dispendiosas, necessitando de uma análise de custo-benefício antes da utilização na rotina (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

As regiões internas espaçadoras (ITS, do inglês *Internal Transcribed Spacer*) e do domínio D1/D2 do ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA) são frequentemente utilizadas em análises moleculares e filogenéticas de fungos, uma vez que acumularam mais mutações quando comparadas às regiões codificadoras, o que permite estimar o tempo de divergência entre os táxons (LEITE et al., 2020).

A análise dessas sequências vem sendo empregado na identificação, classificação taxonômica e caracterização intra e interespecífica de espécies fúngicas, pois possuem alto nível de variabilidade e de cópias no genoma, servindo de referência como código de barras (*barcode*) na diferenciação das espécies (SCHOCH et al., 2012).

O rDNA dos fungos é formado pelos genes 18S, 5.8S e 26S ou 28S que são altamente conservados, possuindo papel fundamental na tradução do RNA em proteínas. Os domínios D1/D2 apresentam entre 300 e 800 pares de base (pb), fazendo parte do gene 26 ou 28S, enquanto as regiões ITS1 e ITS2 possuem entre 400 e 800 pb e são flanqueadas pelos genes 18S, 5.8S e 26 ou 28S (Figura 2) (REISS et al., 2011; KWIATKOWSKI et al., 2012; KIDD et al., 2016; WICKES & WIEDERHOLD, 2018).

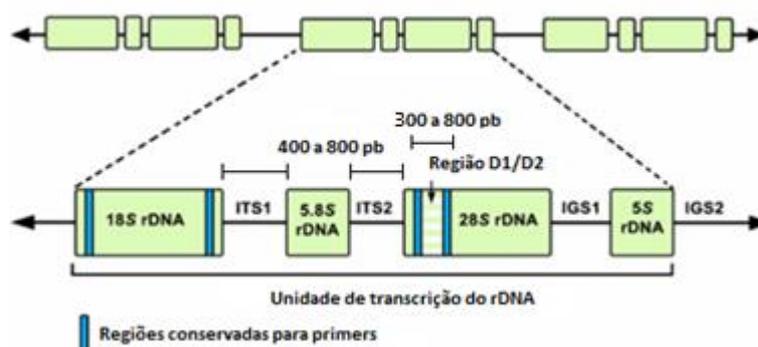


Figura 2 – Diagrama esquemático do gene fúngico rDNA.

Fonte: adaptado de KIDD et. al. (2016).

A região ITS e o domínio D2 normalmente apresentam resultados satisfatórios na identificação de táxons superiores (gênero, família e ordem) e em nível de espécie. A disponibilidade de um sistema comercial, como o kit de sequenciamento de fungos

MicroSEQ™ D2 rDNA, comercializado pela Applied Biosystems, possibilita uma otimização das etapas de amplificação e sequenciamento do domínio D2, fornecendo uma solução rápida para a identificação de espécies fúngicas através da comparação e da análise filogenética com um banco de dados (ROZYNEKA et al., 2004).

Uma das limitações do sequenciamento e das análises moleculares é a presença de espécies de microrganismos estreitamente relacionadas, ou seja, que possuem genes de interesse filogenético idêntico ou muito semelhante (SAMSON et. al., 2004).

Um estudo realizado por Hinrikson e colaboradores (2005) demonstrou que a sequência do domínio D2 é idêntica para diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, inclusive para a cepa de referência recomendada na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019) *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, que já pertenceu ao complexo *A. niger* e posteriormente foi reclassificada como *A. brasiliensis*. Essa limitação pode ser sanada com o sequenciamento de um número maior de genes, como a técnica conhecida como análise de múltiplos locus (MLSA, do inglês *Multilocus sequence analysis*), de forma a obter uma identificação segura, visto que, para fungos filamentosos, não é possível a diferenciação de sequências nos casos em que a identidade for superior a 99,6% para a região ITS e 99,8% para o domínio D2 (GROENEWALD et. al., 2019).

A presença de sequências depositadas em banco de dados com anotação inadequada ou incompleta pode levar a imprecisões e provocar erros de identificação em estudos que consideram apenas a comparação simples de sequências com bancos de dados utilizando a ferramenta BLAST sem a realização de análises filogenéticas mais detalhadas (PERTSEMLIDIS & FONDON, 2001; XU, 2016).

Apesar disso, a disponibilidade de bibliotecas validadas com sequências de referência para genes de interesse, incluindo a biblioteca de genes de fungos MicroSEQ ID comercializada pela Applied Biosystems, tem permitido a comparação e identificação segura de espécies desconhecidas (HALL et al., 2003). Alguns autores utilizaram este kit para identificação de fungos filamentosos de origem clínica, mas este não foi capaz de identificar todas as linhagens até o nível de gênero e/ou espécie (ARBEFEVILLE et al., 2017; HALL et al., 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificados poucos trabalhos na literatura referentes à identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas, sendo três realizados no Brasil. Os gêneros mais ocorrentes relatados na literatura consultada foram: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estudos nessa área devem ser encorajados e seus resultados devem ser publicados e disponibilizados para comunidade científica, de forma a permitir a comparação entre as microbiotas das áreas produtivas e aprimoramento das metodologias para identificação de fungos filamentosos.

Das metodologias de análise identificadas na literatura, os métodos proteotípicos e moleculares foram os mais utilizados e parecem ser os mais confiáveis para a identificação de fungos filamentosos em indústrias farmacêuticas. Contudo, a implementação destas técnicas dependerá da disponibilidade de equipamentos, insumos, de uma equipe especializada, além da estratégia adotada na análise de risco durante os processos e produtos envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos/Fiocruz do qual F. Mercês é aluno do curso de Mestrado Profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz do qual R. Lage é aluna do curso de Mestrado Acadêmico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ANDRADE; L. O; et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacteria isolated from pharmaceutical clean rooms. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 45-53, 2018.

ANDRADE JÚNIOR, F. P.; et al. Presença de *Aspergillus* em Hospitais Brasileiros: uma revisão integrativa. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 4, n. 3, p. 1242-1253, 2019.

ARBEFEVILLE, S. et al. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. **Journal of microbiological methods**, v. 140, p. 40-46, 2017.

BAIN, D.; et al. Microbial Monitoring For Biological Drug Substance Manufacturing: An Industry Perspective. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 69, p. 451-460, 2015.

BATRA, N.; et al. *Cladosporium sphaerospermum* causing brain abscess, a saprophyte turning pathogen: Case and review of published reports. **J Mycol Med**, v. 29, n. 2, p. 180-184, 2019.

BEN TAHEUR; F.; et al. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. **Toxicon**, v. 160, p. 12-22, 2019.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial União, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN nº 43 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares aos sistemas computadorizados utilizados na fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 ago. 2019. Seção 1, p. 89-90, 2019a.

BRASIL. Resolução RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago. 2019. Seção 1, p.64-111, 2019b.

CASSAGNE, C.; et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. **Mycoses**, v. 59, p. 678-690, 2016.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (CFR). **Guidance for industry**. Part 11, Eletronic Records; Eletronic Signatures – Scope and Application, 2003.

COSTA, L. V.; et al. Comparison between different automated methodologies for the identification of gram-positive rods isolated from clean rooms. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL**, 4., 2019; SEMINÁRIO ANUAL CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DE BIO-MANGUINHOS, 7., 2019, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, p. 156, 2019.

COSTA, L. V.; et al. Microbial profile of intermediate process solutions identified by bioburden test in a pharmaceutical industry. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOBIOLOGICAL**, 5., 2021a. Rio de Janeiro. Annals... Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, p. 45, 2021a.

COSTA, L. V.; et al. Expansion of MALDI-TOF MS database for identification of Bacillus and related genera from microbiota of pharmaceutical clean rooms. In: II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas. Anais do II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2021b.

CROXATTO, A.; et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

CRUZ, F. V. Caracterização fenotípica de fungos isolados do controle microbiológico de Bio-Manguinhos/Fiocruz e estruturação de uma micoteca. 2015. 119f. **Tese** (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

DELAVY, M; et al. Investigating Antifungal Susceptibility in Candida Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9 n. 19, 2019.

ELBEHIRY, A; et al. Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products. **New Microbiologica**, v. 40, n. 4, p. 269-278, 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Science Medicines Health. Annex 1 Revision: **Manufacture of Sterile Medicinal Products** (Draft). Bruxelles, 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. 2 v. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira>>. Acesso em: 15 de set. de 2021.

FLAUDROPS, C.; et al. Value of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in clinical microbiology and infectious diseases in Africa and tropical areas. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 35, p. 1360-1370, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing**. Current Good Manufacturing Practice, 2004.

GAUTIER, M. et al. Previously unknown species of Aspergillus. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, n. 8, p. 662-9, 2016.

GOW, N. A. R.; et al. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology spectrum**, vol. 5, n. 3, 2017.

GROENEWALD, D. V. et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, p.135–154, 2019.

HALL, L.; WOHLFIEL, S.; ROBERTS, G. D. Experience with the MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for Identification of Commonly Encountered, Clinically Important Yeast Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5099–5102, 2003.

HALL, L.; WOHLFIEL, S.; ROBERTS, G. D. Experience with the MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for Identification of Filamentous Fungi Encountered in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.11, p. 622-626, 2020.

HINRIKSON, H. P. et al. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular

Identification of Medically Important *Aspergillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.5, p. 2092–2103, 2005.

HYDE, T.; ANSTEAD, J. A.; SCHADE, L.; ZELLNER, J. Microbial identification in pharmaceutical compounding. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, n. 1, p13-18, 2016.

ISO 14644-1. Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration, 2015.

JOLLEY, K. A. et al. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Res.** v. 3, n. 124, 2018.

KIDD, S.; et al. Descriptions of Medical Fungi. **Australian and New Zealand Micology Interest Group**, 3^o edição, 2016.

KHOT, P. and FARRANCE, C. Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Identification of Yeasts Commonly Found During Environmental Monitoring. **American Pharmaceutical Review**, v: 19, 2016.

KOEHLER, P.; et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 21, n. 6, e149-e162, 2021.

KWIATKOWSKI, N. P. et al. Evaluation of Nucleic Acid Sequencing of the D1/D2 Region of the Large Subunit of the 28S rDNA and the Internal Transcribed Spacer Region Using SmartGene IDNS Software for Identification of Filamentous Fungi in a Clinical Laboratory. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 4, 2012.

LAGE, R.V., et al. Phenotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. In: **II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas**, Online. Anais do II Congresso Online Nacional de Ciências Farmacêuticas, 2021.

LEITE, L. N. Molecular identification and characterization of filamentous fungi and yeasts isolated in a pharmaceutical industry environment. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 7, p. 027-036, 2020.

LOONEN, A. J. M.; et al. Comparative study using phenotypic, genotypic, and proteomics methods for identification of coagulase-negative staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1437-9, 2012.

LUETHY, P. M. and ZELAZNY, A. M. Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 91, n. 2, p. 130-135, 2018.

MAGRINE, I. C.; et al. Intake of aflatoxins through the consumption of peanut products in Brazil. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 4, n. 2, p. 99-105, 2011.

MATUTE, D. R.; et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MEDEIROS L. M. Criação da Bacterioteca de Bio-Manguinhos, Caracterização de Linhagens Bacterianas e Desenvolvimento de um Sistema Integrado de Identificação de Microrganismos e de Rastreamento de Fontes de Contaminação. 2015. 261 f. **Tese** (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

PATEL, R. A Moldy Application of MALDI: maldi-tof mass spectrometry for fungal identification. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 327-245, 2019.

PIERRE, T.; et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. **Medical Mycology**, v. 52, n. 8, p. 826–834, 2014.

PERTSEMLIDIS, A. and FONDON, J. W. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). **Genome Biology**, v. 2, p. 1-10, 2001.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 3. ed. São Paulo: **Atheneu Editora**, 2010.

PINTO, F. C. J.; et al. Morphological and Molecular Identification of Filamentous Fungi Isolated from Cosmetic Powders. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 55, n. 6, p. 897-901, 2012.

PITT, J. I. and MILLER, J. D. A. Concise History of Mycotoxin Research. **J Agric Food Chem**. v. 65, n. 33, p. 7021-7033, 2017.

RAHI, P. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1359, 2016.

RANQUE, S.; NORMAND, A. C.; CASSAGNE, C.; et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. **Mycoses**, v. 57, p. 135-140, 2013.

REICH, M.; et al. Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **J Bacteriol Parasitol**, S5-002, 2013.

REISS, S.; SHADOMY, H. J.; LYON G. M. Fundamental medical mycology. **In: Fundamental Medical Mycology**, v. 3, n. 28, p. 527–565, 2011.

ROZYNEKA, P. et al. Quality test of the MicroSeq D2 LSU Fungal Sequencing Kit for the identification of fungi. **Int J Hyg Environ Health**, v. 207, n. 3, p. 297-9,2004.

SALES, M. P. U. Capítulo 5 - Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1238-1244, 2009.

SAMSON, R. A. et al. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 175-200, 2004.

SANDLE, T. Study of fungi isolated from pharmaceutical cleanrooms: Types and origins. **European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, 2021.

SCHOCH, C. L; et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SIMÕES, M. F.; et al. Polyphasic Identification and Preservation of fungal Diversity: Concepts and Applications. **Management of Microbial Resources in the Environment**, 2013.

SUTTON, S. V. W. and CUNDELL, A. M. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacoepial Forum**, v. 35, n. 5, p. 1884 – 1894, 2004.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores moleculares na era genômica: Metodologias e Aplicações. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 181, 2017.

UTESCHER, C. L. A; et al. Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, 2007.

VAM VEEN, S. Q.; CLASS, E. C. J.; KUIJPER, Ed. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900-7, 2010.

VASCONCELOS, L., et al. Phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* as a tracking tool for investigation in a pharmaceutical industry. In: **V International Symposium on Immunobiologicals**. Rio de Janeiro. Annals... Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, p. 48, 2021.

VELOO, A. C. M.; et al. Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. **Anaerobe**, v. 54, p. 224-230, 2018.

VIJAYAKUMAR, R.; SANDLE, T.; MANOHARAN, C. A review on fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional methods. **European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 4-18, 2012.

VIJAYAKUMAR, R.; AL-ABOODY, M. S.; SANDLE, T. A review of melanized (black) fungal contamination in pharmaceutical products—incidence, drug recall and control measures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4. p.831-841, 2015.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). National Formulary. Rockville: U.S. Pharmacopeia, Issue 1, 2021. Disponível em: <<https://online.uspnf.com/uspnf>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

WICKES, B. L. and WIEDERHOLD, N. P. Molecular diagnostics in medical mycology. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 5135, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2011). WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principles. Annex 3. **WHO Technical Report Series**, n. 961.

XU, J. Fungal DNA barcoding. **Genome**, v. 59, p. 913–932, 2016.

YUNES, N. B. S.; et al. Effect of temperature on growth, gene expression, and aflatoxin production by *Aspergillus nomius* isolated from Brazil nuts. **Mycotoxin Res**, v. 36, n. 2, p. 173-180, 2020.