UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ“ DIN TIMIȘOARA

George Andrei Drăghici
Conf. univ. dr. habil. ing.

Diana Haj Ali
Asist. univ. drd. farm.

Industria medicamentului și biotehnologii farmaceutice

Îndrumar de lucrări practice de laborator



GHIDURI ȘI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Editura “Victor Babeș”
Timișoara, 2026

Editura „Victor Babeş”

Piaţa Eftimie Murgu nr. 2, cam. 316, 300041 Timişoara

Tel./ Fax 0256 495 210

e-mail: evb@umft.ro

https://www.umft.ro/ro/organizare-evb/

Director general: Prof. univ. dr. Sorin Ursoniu

Colecţia: GHIDURI ŞI ÎNDRUMĂTOARE DE LABORATOR

Coordonator colecţie: Prof. univ. dr. Adrian Vlad

Referent ştiinţific: Prof. univ. dr. Cristina Adriana Dehelean

Indicativ CNCSIS: 324

© 2026

Toate drepturile asupra acestei ediţii sunt rezervate.
Reproducerea parţială sau integrală a textului, pe orice suport, fără acordul scris al autorilor este interzisă şi se va sancţiona conform legilor în vigoare.

ISBN **978-606-786-673-5**

Cuprins

Cuvânt înainte 4

Reguli generale de lucru şi de protecţie a muncii 5

Noţiuni generale de tehnică de laborator şi prelucrarea datelor 6

Lucrarea 1. Formele farmaceutice: de la preparatele tradiţionale la tehnologiile moderne 11

Lucrarea 2. Procesul de dezvoltare a medicamentului. Solubilitatea substanţei active 18

Lucrarea 3. Materii prime în industria farmaceutică: umiditate, apă purificată, control de pH 25

Lucrarea 4. Operaţii unitare mecanice şi termice: mărunţirea, cernerea, evaporarea 32

Lucrarea 5. Operaţii unitare de difuziune şi separare: dializa şi filtrarea sub vid 39

Lucrarea 6. Sinteza chimică a unei substanţe medicamentoase: acidul acetilsalicilic 45

Lucrarea 7. Fermentaţia alcoolică cu Saccharomyces cerevisiae 51

Lucrarea 8. Metabolismul aerob şi anaerob al drojdiilor. Rolul oxigenului în fermentaţii 58

Lucrarea 9. Enzime proteolitice: hidroliza cazeinei cu papaină şi tripsină 64

Lucrarea 10. Biosinteza antibioticelor: activitatea antibacteriană a culturilor de Penicillium 70

Lucrarea 11. Activitatea enzimatică a catalazei 78

Lucrarea 12. Bacterii lactice şi probiotice: cultivare şi activitate fermentativă 84

Lucrarea 13. Procesarea în aval: izolarea şi purificarea parţială a proteinelor din lapte 91

Lucrarea 14. Buna practică de fabricaţie şi producţia aseptică: monitorizarea microbiologică a mediului şi a operatorului 99

Lucrarea 15. Tehnici de cultivare şi conservare a culturilor celulare in vitro, cu aplicaţii în industria farmaceutică 106

Anexa 1. Corespondenţa lucrărilor cu capitolele manualului 119

Anexa 2. Relaţii de calcul şi constante utile 120

Anexa 3. Răspunsuri la problemele propuse şi la testele de autoevaluare 121

Anexa 4. Reactivii utilizaţi şi pericolele lor 124

Anexa 5. Glosar de termeni 126

Bibliografie selectivă 128

Cuvânt înainte

Îndrumarul de față însoțește manualul „Industria medicamentului și biotehnologii farmaceutice. De la substanța activă la producția farmaceutică modernă" (Editura „Victor Babeș", Timișoara, 2026) și acoperă cele 15 lucrări practice ale disciplinei, din semestrul I al anului V.

Lucrările urmează firul manualului: de la formele farmaceutice și dezvoltarea medicamentului, prin materiile prime și operațiile unitare, la sinteza chimică, fermentații, enzime, procesarea în aval și buna practică de fabricație. Fiecare lucrare indică, la început, capitolul corespunzător din manual, care trebuie parcurs înaintea ședinței de laborator.

Toate lucrările au aceeași structură: obiective, noțiuni teoretice, principiul lucrării, materiale și reactivi, protecția muncii, mod de lucru, calcule, rezultate, interpretare și întrebări. Fiecare lucrare conține figuri și scheme ale montajelor și proceselor, exemple de calcul rezolvate cu date numerice realiste, aplicațiile industriale ale noțiunilor studiate, sursele frecvente de erori, probleme propuse și un test de autoevaluare. Răspunsurile la probleme și la teste se găsesc în Anexa 3. Un capitol introductiv prezintă tehnicile de bază și prelucrarea statistică a datelor, comune tuturor lucrărilor. Tabelele de rezultate se completează în timpul lucrării, iar întrebările finale servesc la pregătirea evaluării.

Reguli generale de lucru și de protecție a muncii

Înainte de lucrare

- se citesc capitolul corespunzător din manual şi protocolul lucrării;
- se identifică reactivii periculoşi şi măsurile de protecţie (fişele cu date de securitate);
- accesul în laborator se face numai cu halat încheiat; părul lung se prinde.

În timpul lucrării

- se poartă ochelari de protecţie şi mănuşi adecvate;
- în laborator nu se mănâncă, nu se bea şi nu se folosesc cosmetice;
- nu se pipetează cu gura; se folosesc pipete cu pară sau pipete automate;
- reactivii volatili, corozivi sau lacrimogeni se manipulează numai sub nişă;
- se lucrează aseptic la lucrările de microbiologie: suprafaţa se dezinfectează înainte şi după lucru, iar culturile nu se deschid inutil;
- orice accident (tăietură, arsură, stropire în ochi) se anunţă imediat cadrului didactic.

Gestionarea deșeurilor

- solvenţii organici se colectează în recipiente separate, etichetate;
- soluţiile acide şi bazice se neutralizează înainte de evacuare;
- culturile microbiene, plăcile şi mediile se autoclavează (121 °C, 20 de minute) înainte de eliminare;
- sticlăria spartă se colectează în recipientul dedicat.

Înregistrarea rezultatelor

Rezultatele se notează direct în îndrumar sau în caietul de laborator, cu pixul, în momentul observaţiei. Corecturile se fac prin tăiere cu o singură linie, astfel încât valoarea iniţială să rămână lizibilă — aceleaşi reguli de integritate a datelor se aplică în industria farmaceutică (lucrarea 14).

Noțiuni generale de tehnică de laborator și prelucrarea datelor

Rezultatele lucrărilor practice depind în aceeaşi măsură de protocol şi de tehnica de lucru. Capitolul de faţă reuneşte noţiunile comune tuturor lucrărilor: măsurarea volumelor şi a maselor, utilizarea pH-metrului, prepararea soluţiilor, prelucrarea statistică a datelor şi redactarea referatului.

1. Sticlăria volumetrică și măsurarea volumelor

Sticlăria volumetrică este etalonată fie „pentru a conţine” (TC, In — balonul cotat), fie „pentru a livra” (TD, Ex — pipeta, biureta). Clasa A are toleranţe de aproximativ două ori mai mici decât clasa B şi se foloseşte în analizele cantitative. Cilindrul gradat şi paharele gradate servesc numai la măsurători aproximative.

Instrument (clasa A)	Volum nominal	Toleranță	Eroare relativă
Pipetă cotată	10 mL	± 0,02 mL	0,2 %
Pipetă cotată	25 mL	± 0,03 mL	0,12 %
Biuretă	50 mL	± 0,05 mL	0,1 %
Balon cotat	100 mL	± 0,10 mL	0,1 %
Balon cotat	250 mL	± 0,15 mL	0,06 %
Cilindru gradat	100 mL	± 0,5 mL	0,5 %

Volumul se citeşte cu ochiul la nivelul meniscului, pentru a evita eroarea de paralaxă (figura G.1). Pipeta se clătește de două ori cu soluţia de măsurat şi se goleşte liber, sprijinită de peretele vasului; picătura rămasă în vârf nu se suflă, dacă pipeta nu este marcată pentru suflare.

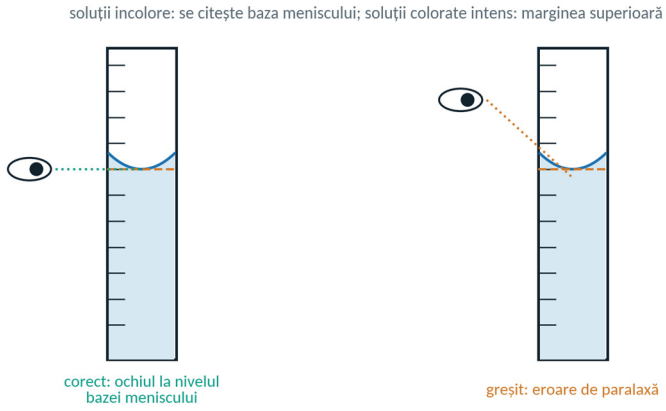


Figura G.1. Citirea corectă a meniscului.

2. Cântărirea

Balanța analitică are diviziunea d = 0,1 mg. Înainte de lucru se verifică nivelul (bula de nivel) și, periodic, exactitatea cu mase etalon. Substanțele se cântăresc în recipiente de cântărire, niciodată direct pe taler; substanțele higroscopice sau volatile se cântăresc prin diferență, în recipient închis. Obiectele calde nu se cântăresc: curenții de convecție falsifică rezultatul.

Pentru fiecare balanță există o **masă minimă** sub care eroarea relativă devine inacceptabilă. Conform practicii farmacopeice, repetabilitatea este satisfăcătoare dacă de două ori abaterea standard a cântăririlor repetate, raportată la masa cântărită, nu depășește 0,10 %.

EXEMPLU DE CALCUL — masa minimă

Abaterea standard a 10 cântăriri repetate ale aceleiași mase este s = 0,04 mg.

masa minimă = 2 × s / 0,0010 = 2 × 0,04 / 0,0010 = 80 mg

→ Pe această balanță nu se cântăresc cu exactitate farmacopeică mase mai mici de 80 mg; pentru cantități mai mici se prepară o soluție stoc și se diluează.

3. Măsurarea pH-ului

pH-metrul măsoară diferența de potențial dintre electrodul de sticlă și un electrod de referință. Dependența teoretică este dată de ecuația lui Nernst: la 25 °C, potențialul variază cu 59,16 mV pe unitate de pH. Electrodul se calibrează zilnic cu cel puțin două soluții tampon care încadrează pH-ul probelor (figura G.2). Panta acceptabilă este de 95–105 % din valoarea teoretică; o pantă mai mică indică un electrod îmbătrânit sau contaminat.

EXEMPLU DE CALCUL — calibrarea în două puncte

Tampon pH 4,01 → +175,2 mV; tampon pH 7,00 → +1,5 mV (25 °C).

pantă = (175,2 − 1,5) / (7,00 − 4,01) = 173,7 / 2,99 = 58,09 mV/pH → 58,09 / 59,16 = 98,2 % (acceptabil)

O probă dă +60,0 mV:

pH = 7,00 − (60,0 − 1,5) / 58,09 = 7,00 − 1,01 = 5,99

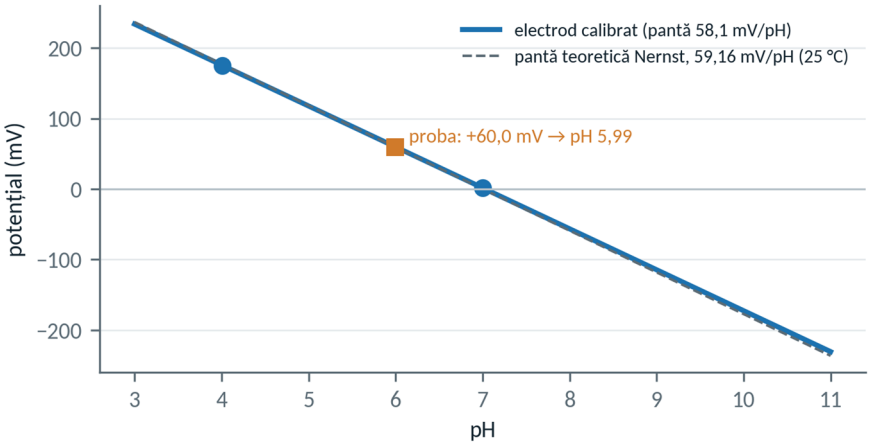


Figura G.2. Dreapta de calibrare a electrodului de pH.

Electrodul se păstrează în soluție de KCl 3 M, nu în apă distilată; se clătește cu apă purificată între probe și se tamponează ușor, fără frecare. Temperatura se compensează automat sau se notează, deoarece atât panta, cât și pH-ul tampoanelor depind de temperatură.

4. Prepararea soluțiilor

Mod de exprimare	Definiție	Exemplu
Molaritate (M)	mol substanță / L soluție	NaOH 0,1 M: 4,00 g/L
Procent masă/volum (% m/V)	g substanță / 100 mL soluție	glucoză 10 %: 10 g în 100 mL
Procent masă/masă (% m/m)	g substanță / 100 g soluție	H_2SO_4 96 %
Procent volum/volum (% v/v)	mL substanță / 100 mL soluție	etanol 70 %
Părți pe milion (ppm)	mg / kg sau mg / L (soluții apoase diluate)	0,05 % = 500 ppm

EXEMPLE DE CALCUL — prepararea soluțiilor

1) 250 mL NaOH 0,1 M din NaOH solid (M = 40,00):

$$m = 0{,}1 \text{ mol/L} \times 0{,}250 \text{ L} \times 40{,}00 \text{ g/mol} = 1{,}000 \text{ g}$$

2) 100 mL H_2SO_4 1 M din acid 96 % (ρ = 1,84 g/mL; M = 98,08):

c acid concentrat = 1,84 × 1000 × 0,96 / 98,08 = 18,0 M; V = 1 × 100 / 18,0 = 5,55 mL

→ Acidul se adaugă întotdeauna în apă, lent și cu agitare — niciodată apă peste acid.

3) 50 mL etanol 70 % (v/v) din etanol 96 %:

V = 70 × 50 / 96 = 36,5 mL etanol 96 %, completat cu apă la 50 mL (contracția de volum face necesară completarea la semn).

5. Prelucrarea datelor experimentale

Erorile sistematice deplasează toate rezultatele în același sens (balanță necalibrată, titrant cu factor greșit) și nu se reduc prin repetare; se elimină prin calibrare și prin standarde. **Erorile aleatorii** produc împrăștierea rezultatelor și se estimează prin abaterea standard. **Exactitatea** descrie apropierea de valoarea adevărată, **precizia** — apropierea rezultatelor între ele.

$$\bar{x} = \Sigma x_i / n \qquad s = \sqrt{[\,\Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)\,]} \qquad CV = s / \bar{x} \times 100\ \% \qquad IC\ 95\ \% = \bar{x} \pm t \cdot s / \sqrt{n}$$

n (determinări)	2	3	4	5	6	10
t (95 %, bilateral)	12,71	4,30	3,18	2,78	2,57	2,26

EXEMPLU DE CALCUL — intervalul de încredere

Timpii de dezagregare din lucrarea 1: $\bar{x}$ = 4,83 min; s = 0,35 min; n = 3.

$$IC\ 95\ \% = 4{,}83 \pm 4{,}30 \times 0{,}35 / \sqrt{3} = 4{,}83 \pm 0{,}87 \text{ min} \quad (3{,}96–5{,}70 \text{ min})$$

→ Cu doar trei determinări intervalul este larg; cu șase determinări și aceeași abatere standard, semilărgimea scade la 0,37 min.

Când un rezultat este calculat din mai multe mărimi măsurate, incertitudinile se propagă. Pentru produse și rapoarte, incertitudinile relative se combină pătratic:

$$u(y)/y = \sqrt{[\,(u(x_1)/x_1)^2 + (u(x_2)/x_2)^2 + \ldots\,]}$$

EXEMPLU DE CALCUL — propagarea incertitudinii

Soluție standard: 0,2105 g (± 0,0002 g) dizolvate în balon cotat de 100 mL (± 0,10 mL).

u rel = $\sqrt{[(0{,}0002/0{,}2105)^2 + (0{,}10/100)^2]} = \sqrt{(9{,}0 \times 10^{-7} + 1{,}0 \times 10^{-6})} = 0{,}0014 \rightarrow 0{,}14\ \%$

→ Concentrația: 2,105 mg/mL ± 0,003 mg/mL. Cele două surse contribuie aproape egal.

Curbele de etalonare (spectrofotometrie, dozare microbiologică) se construiesc prin regresie liniară, metoda celor mai mici pătrate. Se raportează ecuația dreptei, coeficientul de determinare R^2 și domeniul de liniaritate; concentrațiile probelor se calculează numai prin interpolare, nu prin extrapolare (figura G.3).

$$y = a + b \cdot x \qquad b = \Sigma(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \,/\, \Sigma(x_i - \bar{x})^2 \qquad a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

EXEMPLU DE CALCUL — regresie liniară

Standarde: 0, 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL; absorbanțe: 0,002; 0,101; 0,198; 0,305; 0,399; 0,502.

$\bar{x} = 5{,}00$; $\bar{y} = 0{,}2512$; $b = 0{,}0500$ mL/µg; $a = 0{,}0011$; $R^2 = 0{,}9998$

probă $A = 0{,}250$: $c = (0{,}250 - 0{,}0011) / 0{,}0500 = 4{,}98$ µg/mL

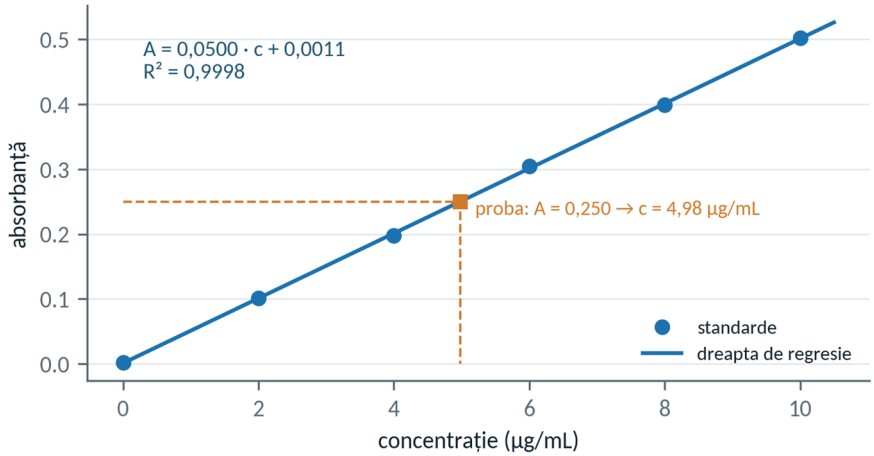


Figura G.3. Curba de etalonare din exemplul de calcul.

Cifrele semnificative. Rezultatul se raportează cu atâtea cifre câte permite măsurătoarea cea mai puțin precisă. La înmulțire și împărțire, rezultatul are numărul de cifre semnificative al factorului cu cele mai puține; la adunare și scădere, numărul de zecimale al termenului cu cele mai puține zecimale. Rotunjirea se face o singură dată, la rezultatul final.

6. Redactarea referatului de laborator

1. Titlul lucrării, data, numele studentului și ale colegilor de echipă.
2. Scopul lucrării — una sau două fraze.
3. Principiul — reacțiile și relațiile de calcul folosite.
4. Materiale și mod de lucru — numai abaterile față de protocolul din îndrumar.
5. Rezultate — datele brute în tabele, cu unități de măsură; graficele cu axe denumite.
6. Calcule — un calcul complet, cu toate etapele, pentru o determinare; rezultatele celorlalte, în tabel.
7. Interpretare — comparația cu valorile teoretice, cu specificațiile sau cu martorii; sursele de eroare identificate.
8. Concluzie — răspunsul la scopul lucrării.

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 1

Formele farmaceutice: de la preparatele tradiționale la tehnologiile moderne

Manual: *Capitolul 1 — Industria farmaceutică: evoluție, organizare și perspective*

Obiective

- recunoașterea principalelor forme farmaceutice solide şi lichide şi a tehnologiilor care le-au generat;
- compararea formelor tradiționale (comprimat neacoperit, drajeu) cu cele moderne (comprimat filmat, liofilizat);
- evaluarea comparativă a comportamentului la dezagregare a două comprimate cu tehnologie de fabricație diferită.

Noțiuni teoretice

Trecerea de la prepararea oficinală la producția industrială a schimbat nu doar scara, ci și natura formelor farmaceutice. Filmarea, granularea, peletizarea, matricile cu eliberare modificată și liofilizarea au permis mascarea gustului, protecția substanței active față de umiditate, lumină sau pH-ul gastric, controlul vitezei de eliberare și stabilitatea pe termen lung a moleculelor labile.

Pentru o formă solidă orală, **dezagregarea** este prima etapă a eliberării: comprimatul trebuie să se fragmenteze pentru ca substanța activă să se poată dizolva și absorbi. Timpul de dezagregare depinde de excipienți (dezagreganți, lianți, lubrifianți), de forța de comprimare și de prezența și natura învelișului.

> **PRECIZARE**
> Testul vizual din această lucrare are caracter demonstrativ. Testul farmacopeic de dezagregare (Ph. Eur. 2.9.1) se efectuează cu aparatul cu coșuleț, în apă la 37 ± 2 °C. Limitele uzuale sunt de 15 minute pentru comprimatele neacoperite și de 30 de minute pentru comprimatele filmate; comprimatele gastrorezistente nu trebuie să se dezagrege 2 ore în acid clorhidric 0,1 M.

Istoria formelor farmaceutice poate fi citită ca o succesiune de răspunsuri tehnologice la probleme concrete (figura 1.1): comprimatul a rezolvat dozarea exactă și transportul, drajeul și apoi filmul au rezolvat gustul și protecția substanței active, peletele și matricile au permis eliberarea modificată, iar liofilizarea a făcut posibilă conservarea moleculelor instabile în soluție, inclusiv a proteinelor.

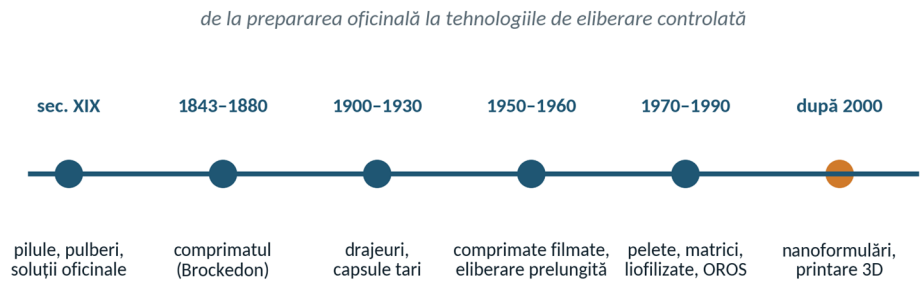


Figura 1.1. Evoluția formelor farmaceutice solide și a tehnologiilor asociate.

Structura internă a formei farmaceutice determină comportamentul ei la contactul cu lichidele biologice (figura 1.2). Comprimatul neacoperit se dezagregă direct, sub acțiunea dezagregantului (amidon, croscarmeloză, crospovidonă), care absoarbe apă și se umflă. Comprimatul filmat are un strat subțire de polimer (hipromeloză, copolimeri metacrilici), care trebuie mai întâi hidratat sau dizolvat. Drajeul are straturi groase de zahăr, iar capsula cu pelete împarte doza în sute de unități mici, fiecare cu propriul film.

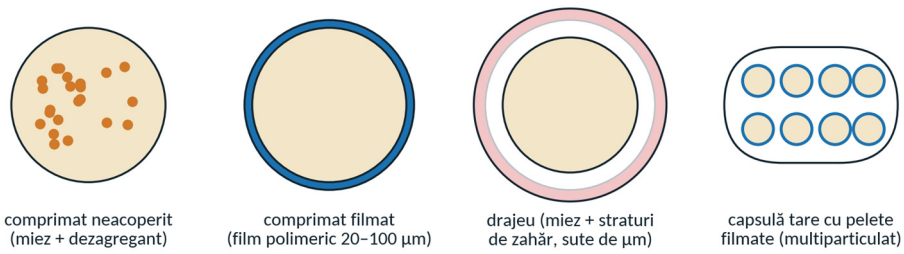


Figura 1.2. Secțiuni schematice prin principalele forme orale solide.

Formă	Avantaje principale	Limite
Comprimat neacoperit	cost redus, fabricație rapidă, divizibil	gust, sensibilitate la umiditate
Comprimat filmat	mascarea gustului, protecție, identificare	o etapă suplimentară de proces
Drajeu	aspect, mascarea gustului	durată mare de fabricație, masă crescută
Capsulă cu pelete	eliberare modificată reproductibilă, risc redus de „dose dumping”	cost și complexitate tehnologică
Liofilizat	stabilitatea moleculelor labile	cost energetic, reconstituire înainte de administrare

Principiul lucrării

Se examinează macroscopic forme farmaceutice obținute prin tehnologii diferite și se notează caracteristicile fizice ale fiecăreia. Două comprimate diferite (unul neacoperit, unul filmat) sunt introduse simultan în apă, în condiții identice, iar etapele dezagregării sunt cronometrate și comparate.

Materiale și echipamente

Forme farmaceutice pentru observație

- comprimate neacoperite (clasice);
- comprimate filmate;
- capsule gelatinoase tari (cu pulbere sau pelete);
- drajeuri;
- fiole cu soluții injectabile;
- forme liofilizate (pulbere pentru reconstituire).

Pentru testul de dezagregare

- comprimat A — neacoperit; comprimat B — filmat;
- 2 pahare Berzelius de 150–250 mL;
- apă distilată, la temperatura camerei sau la 37 ± 2 °C;
- termometru, cronometru, spatulă, marker pentru etichetare.

Protecția muncii

- halat, mănuși din nitril, ochelari de protecție;
- atenție la manipularea fiolelor (sticlă fragilă);
- formele farmaceutice se păstrează în ambalajul original; nu se ingerează.

Mod de lucru

1. Examinarea formelor farmaceutice

1. Se așază pe masa de lucru formele farmaceutice puse la dispoziție.
2. Se notează pentru fiecare: forma, dimensiunea, culoarea, prezența filmului sau a învelișului, marcajele, linia de rupere, uniformitatea.
3. Se compară formele tradiționale (comprimat simplu, drajeu) cu cele moderne (comprimat filmat, liofilizat).
4. Se identifică avantajele și dezavantajele fiecărei forme: gust, stabilitate, protecție față de pH-ul gastric, mod de administrare.

2. Evaluarea vizuală a dezagregării

1. Se etichetează două pahare, A și B, și se introduce în fiecare același volum de apă (150–200 mL).
2. Se verifică temperatura apei (temperatura camerei sau 37 °C) — trebuie să fie identică în ambele pahare.

3. Se introduc simultan comprimatul A în paharul A și comprimatul B în paharul B și se pornește cronometrul.
4. Se notează: momentul apariției fisurilor, desprinderea filmului (dacă există), apariția turbidității, timpul până la dezagregarea completă.
5. Se oprește cronometrul pentru fiecare comprimat în momentul în care nu mai rămân fragmente consistente.
6. Se repetă testul la 37 °C, pentru simularea condițiilor fiziologice.

Calcule

Fiecare comprimat se testează în triplicat. Se calculează media și abaterea standard a timpului de dezagregare, iar rezultatul se compară cu limita farmacopeică.

$$\bar{x} = \Sigma x_i / n; \quad s = \sqrt{[\ \Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)\ ]}; \quad CV\ (\%) = s \times 100 / \bar{x}$$

EXEMPLU DE CALCUL

Comprimatul A (neacoperit), trei determinări la 37 °C: 4,5; 5,2; 4,8 min.

$$\bar{x} = (4{,}5 + 5{,}2 + 4{,}8) / 3 = 4{,}83 \text{ min}$$

$$s = \sqrt{\{[(-0{,}33)^2 + (0{,}37)^2 + (-0{,}03)^2] / 2\}} = \sqrt{(0{,}2467 / 2)} = 0{,}35 \text{ min}; \quad CV = 7{,}3\ \%$$

Comprimatul B (filmat): 11,8; 12,6; 12,1 min → $\bar{x}$ = 12,17 min; s = 0,40 min; CV = 3,3 %.

→ Ambele comprimate respectă limitele (15 min pentru A, 30 min pentru B). Comprimatul filmat are nevoie de aproximativ 7 minute în plus, timp necesar hidratării și ruperii filmului.

Rezultate

Forma farmaceutică	Exemplu (denumire comercială / DCI)	Aspect (culoare, formă, marcaje)	Avantaje / dezavantaje
Comprimat neacoperit			
Comprimat filmat			
Capsulă			
Drajeu			
Fiolă			
Liofilizat			

Comprimat	Temperatura apei (°C)	Apariția fisurilor (min)	Dezagregare totală (min)	Observații
A				
B				

Interpretare

- Timpul de dezagregare diferă semnificativ între comprimate, în funcție de excipienți, de film, de forța de comprimare și de prezența agenților de dezagregare.
- Comprimatele filmate își păstrează inițial integritatea, dar se dezagregă rapid după ruperea filmului.
- Comprimatul neacoperit începe să se dezagrege mai devreme, dar faza finală poate fi mai lentă (aglomerarea particulelor).

Aplicații în industria farmaceutică

În fabricație, formele solide sunt verificate prin **controale în proces** (IPC), efectuate pe probe prelevate periodic de la mașina de comprimat, și prin teste de eliberare a seriei. Testul de dezagregare din lucrare este unul dintre ele; alături de el, farmacopeea prevede teste pentru masă, rezistență mecanică și eliberarea substanței active.

Test (Ph. Eur.)	Ce controlează	Criteriu uzual
Uniformitatea masei (2.9.5)	constanța umplerii matriței	max. 2 din 20 comprimate în afara abaterii admise (±10 % sub 80 mg; ±7,5 % între 80 și 250 mg; ±5 % peste 250 mg); niciunul peste dublul abaterii
Friabilitate (2.9.7)	rezistența la abraziune	pierdere de masă ≤ 1,0 % după 100 de rotații
Rezistența la rupere (2.9.8)	coeziunea comprimatului	specificație proprie produsului (N)
Dezagregare (2.9.1)	fragmentarea în mediu apos	15 min neacoperite; 30 min filmate
Dizolvare (2.9.3)	eliberarea substanței active	de regulă Q = 75–80 % dizolvat în 30–45 min
Uniformitatea conținutului (2.9.40)	distribuția substanței active	valoare de acceptare AV ≤ 15

Pentru comprimatele cu eliberare imediată, dizolvarea este testul care se corelează cel mai bine cu biodisponibilitatea; dezagregarea rămâne un control rapid, util în proces și în dezvoltare.

Surse frecvente de erori

- temperatura apei diferă între pahare sau scade în timpul testului;
- volume diferite de apă sau pahare de dimensiuni diferite;
- comprimatele nu sunt introduse simultan;
- sfârșitul dezagregării este apreciat subiectiv — se stabilește dinainte criteriul („nu mai rămân fragmente consistente”);
- comprimate din serii diferite sau expuse umidității înainte de test.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — uniformitatea masei

Se cântăresc 20 de comprimate: masa totală 6,400 g; masa medie = 320 mg. Abaterea admisă (peste 250 mg): ±5 %, adică 304–336 mg; dublul abaterii: ±10 %, adică 288–352 mg.

Două comprimate au 302 mg și 339 mg; celelalte 18 sunt între 308 și 333 mg.

2 comprimate în afara intervalului ±5 % (maximum admis: 2); 0 comprimate în afara ±10 %

→ Seria este conformă la uniformitatea masei.

EXEMPLUL 2 — friabilitatea

Comprimate de 650 mg: se iau 10 comprimate (masa 6,512 g), se rotesc 100 de rotații, se desprăfuiesc și se recântăresc: 6,468 g.

$$\text{Pierdere} = (6{,}512 - 6{,}468) \times 100 / 6{,}512 = 0{,}044 \times 100 / 6{,}512 = 0{,}68\ \%$$

→ Conform (≤ 1,0 %).

EXEMPLUL 3 — procentul dizolvat

Comprimat cu 500 mg paracetamol, 900 mL mediu de dizolvare. La 30 min, concentrația în mediu este 0,48 mg/mL.

m dizolvată = 0,48 mg/mL × 900 mL = 432 mg; % dizolvat = 432 × 100 / 500 = 86,4 %

→ Pentru Q = 80 %, la prima etapă fiecare unitate trebuie să aibă cel puțin Q + 5 % = 85 %: unitatea este conformă.

Întrebări

1. Ce tehnologii moderne au îmbunătățit formele farmaceutice (filmare, pelete, liofilizare, matrici cu eliberare prelungită)?

2. Cum influențează dezagregarea debutul absorbției substanței active?
3. De ce diferă comportamentul unui comprimat filmat de cel al unui comprimat neacoperit?
4. Ce avantaje au formele liofilizate față de soluțiile injectabile gata preparate?
5. De ce testarea produsului finit nu poate garanta, singură, calitatea unei serii de fabricație?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Masa medie a 20 de comprimate este 180 mg. Două comprimate cântăresc 164 mg și 195 mg, celelalte se încadrează în ±7,5 %. Este seria conformă la uniformitatea masei?
2. La testul de friabilitate, masa comprimatelor scade de la 6,540 g la 6,462 g. Calculați pierderea și interpretați.
3. Un comprimat cu 200 mg ibuprofen eliberează, în 900 mL mediu, o concentrație de 0,19 mg/mL la 30 min. Ce procent s-a dizolvat?
4. Timpii de dezagregare pentru 6 comprimate sunt 3,2; 3,8; 3,5; 4,1; 3,6; 3,4 min. Calculați media, abaterea standard și CV.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Limita farmacopeică de dezagregare pentru comprimatele filmate este:**
   a) 5 minute
   b) 15 minute
   c) 30 de minute
   d) 2 ore
2. **Dezagregantul acționează prin:**
   a) creșterea durității
   b) absorbția apei și umflare, cu fragmentarea comprimatului
   c) mascarea gustului
   d) lubrifierea matriței
3. **Comprimatele gastrorezistente nu trebuie să se dezagrege:**
   a) 2 ore în HCl 0,1 M
   b) 1 oră în tampon pH 6,8
   c) 15 minute în apă
   d) 30 de minute în etanol
4. **Pierderea maximă admisă la testul de friabilitate este:**
   a) 0,1 %
   b) 1,0 %
   c) 5 %
   d) 10 %

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 2

Procesul de dezvoltare a medicamentului. Solubilitatea substanței active

Manual: *Capitolul 2 — De la descoperirea moleculei la substanța medicamentoasă*

Obiective

- reprezentarea etapelor dezvoltării unui medicament, de la ţinta terapeutică la producţia conformă GMP şi farmacovigilenţă;
- determinarea aproximativă a solubilităţii paracetamolului în trei solvenţi utilizaţi în formulare;
- utilizarea termenilor farmacopeici de solubilitate.

Noțiuni teoretice

Dezvoltarea unui medicament parcurge etape succesive: identificarea şi validarea ţintei, selectarea compuşilor „hit" şi „lead", optimizarea candidatului, preformularea şi formularea, studiile preclinice şi clinice, autorizarea de punere pe piaţă, producţia industrială şi farmacovigilenţa. Solubilitatea este una dintre proprietăţile fizico-chimice decisive în preformulare: ea determină alegerea formei farmaceutice, necesitatea cosolvenților sau a surfactanților și, în final, biodisponibilitatea.

Farmacopeea exprimă solubilitatea prin termeni convenționali, definiți prin volumul de solvent (mL) necesar pentru dizolvarea a 1 g de substanță:

Termen	Volum de solvent pentru 1 g substanță
foarte uşor solubil	sub 1 mL
uşor solubil	1–10 mL
solubil	10–30 mL
puțin solubil	30–100 mL
greu solubil	100–1000 mL
foarte greu solubil	1000–10 000 mL
practic insolubil	peste 10 000 mL

Figura 2.1 rezumă parcursul unui medicament inovativ. Etapele timpurii sunt dominate de atriție: din mii de compuși evaluați, doar unul ajunge, în medie, la autorizare. Cerințele de bună practică de fabricație se aplică din momentul în care se fabrică loturi pentru studiile clinice și devin integrale la producția comercială.

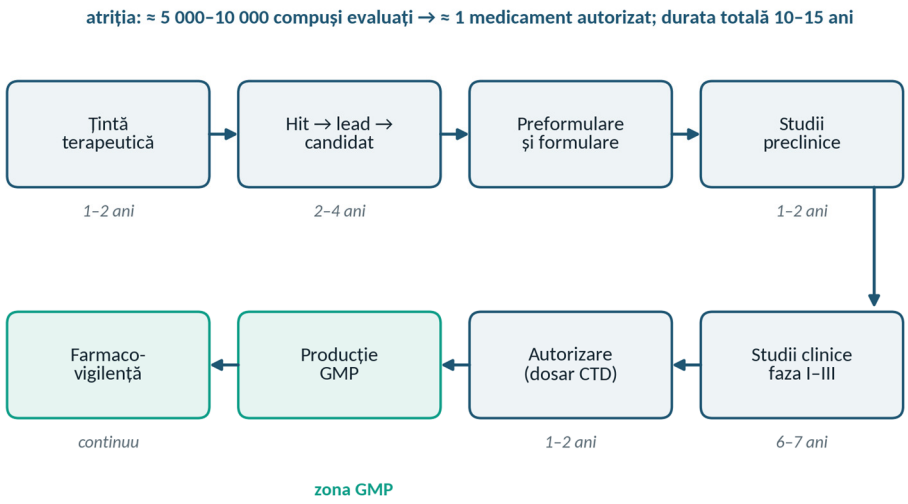


Figura 2.1. Etapele dezvoltării unui medicament inovativ, cu durate orientative.

Sistemul de clasificare biofarmaceutică (BCS, ICH M9) împarte substanțele active în patru clase, după solubilitate și permeabilitate. O substanță are **solubilitate înaltă** dacă cea mai mare doză se dizolvă în cel mult 250 mL mediu apos, pe intervalul de pH 1,2–6,8, la 37 °C. Raportul dintre doză și solubilitate — **numărul de doză** — indică dacă dizolvarea poate limita absorbția.

Număr de doză D_0 = (doza / 250 mL) / solubilitate; $D_0 \leq 1$ → solubilitate înaltă

Clasă BCS	Solubilitate	Permeabilitate	Exemple
I	înaltă	înaltă	paracetamol, metoprolol
II	redusă	înaltă	ibuprofen, carbamazepină
III	înaltă	redusă	aciclovir, metformină
IV	redusă	redusă	furosemid, hidroclorotiazidă

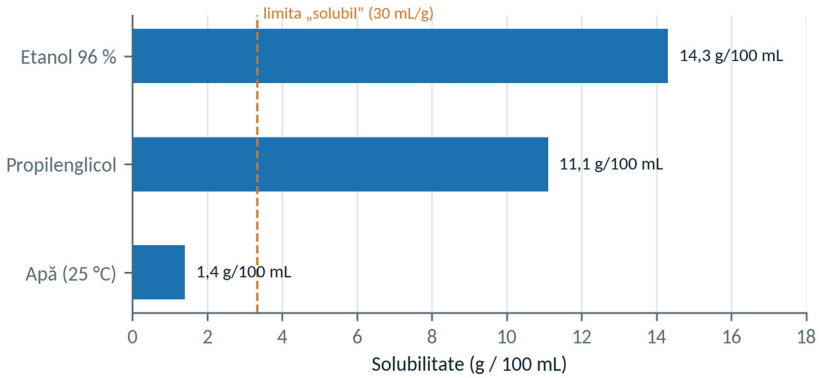


Figura 2.2. Solubilitatea paracetamolului la temperatura camerei (valori de referință din literatură).

Principiul lucrării

Paracetamolul se adaugă în porțiuni cântărite peste un volum fix de solvent, cu agitare, până la persistența unui reziduu nedizolvat. Masa totală dizolvată permite estimarea solubilității (g/100 mL) și încadrarea în termenii farmacopeici.

Materiale și reactivi

- paracetamol (≥ 99 %);
- apă distilată, etanol 96 %, propilenglicol (≥ 99 %);
- 3 eprubete mari sau pahare de 25 mL, pipete gradate, spatulă, cântar analitic, hârtie de cântărire;
- agitator magnetic sau vortex, baie de apă, termometru, cronometru, marker;
- coli de hârtie pentru schema-flux.

Protecția muncii

- halat, mănuși din nitril, ochelari;
- etanolul este inflamabil — nu se lucrează lângă surse de flacără;
- pulberea de paracetamol nu se inhalează; se manipulează cu spatula.

Mod de lucru

1. Schema-flux a dezvoltării medicamentului

Studenții elaborează o schemă logică (flowchart) care cuprinde, în ordine:

1. identificarea țintei terapeutice / a nevoii medicale;
2. selectarea și caracterizarea substanței active (solubilitate, stabilitate, higroscopicitate, pKa, logP);
3. preformulare și formulare experimentală (alegerea excipienților, evaluarea dizolvării);
4. studii preclinice (farmacocinetică, toxicologie);
5. studii clinice de fază I–III;
6. autorizarea de punere pe piață (dosar CTD și evaluare);

7. producție industrială conform GMP (validarea proceselor, controlul calității, documentație și trasabilitate);
8. farmacovigilență după punerea pe piață.

2. Estimarea solubilității paracetamolului

1. Se etichetează trei recipiente: Apă, Etanol, Propilenglicol, și se introduc în fiecare 5,0 mL solvent, la temperatura camerei (se notează temperatura).
2. În recipientul cu apă se adaugă paracetamol în porțiuni de 0,05 g; în cele cu etanol și propilenglicol, în porțiuni de 0,10 g.
3. După fiecare porțiune se agită 2 minute. Se adaugă porțiunea următoare numai dacă cea precedentă s-a dizolvat complet.
4. Se oprește adăugarea la apariția unui reziduu care persistă după agitare; se notează masa totală dizolvată (fără ultima porțiune).
5. Se observă claritatea soluțiilor și, după 10–15 minute, eventuala cristalizare.
6. Opțional: recipientul cu apă se încălzește la 40 °C și se observă creșterea solubilității, apoi recristalizarea la răcire.

Calcule

$$\text{Solubilitate (g/100 mL)} = \text{m dizolvată (g)} \times 100 / \text{V solvent (mL)}$$

$$\text{Volum de solvent pentru 1 g} = \text{V solvent (mL)} / \text{m dizolvată (g)}$$

EXEMPLU DE CALCUL

Etanol: în 5,0 mL s-au dizolvat complet 7 porțiuni de 0,10 g; a opta a lăsat reziduu. m dizolvată = 0,70 g.

Solubilitate = 0,70 × 100 / 5,0 = 14,0 g/100 mL; volum pentru 1 g = 5,0 / 0,70 = 7,1 mL → „ușor solubil”

Apă: s-a dizolvat o porțiune de 0,05 g, a doua nu (reziduu persistent). Solubilitatea este cuprinsă între 1,0 și 2,0 g/100 mL, adică între 50 și 100 mL pentru 1 g → „puțin solubil”.

Număr de doză pentru comprimatul de 500 mg (solubilitate în apă ≈ 14 mg/mL):

$$D_0 = (500 \text{ mg} / 250 \text{ mL}) / 14 \text{ mg/mL} = 2 / 14 = 0{,}14$$

→ $D_0 < 1$: paracetamolul are solubilitate înaltă în sens BCS, deși farmacopeea îl descrie ca „puțin solubil” în apă. Cele două clasificări răspund la întrebări diferite.

Rezultate

Solvent	Volum (mL)	Masă dizolvată (g)	Solubilitate (g/100 mL)	mL solvent / 1 g	Termen farmacopeic
Apă	5,0				
Etanol 96 %	5,0				
Propilenglicol	5,0				

Interpretare

- Paracetamolul este puțin solubil în apă la temperatura camerei (aproximativ 1 g în 70 mL) și mai solubil în apă caldă.
- Este ușor solubil în etanol (aproximativ 1 g în 7 mL) și în propilenglicol (aproximativ 1 g în 9 mL).
- Diferențele explică utilizarea etanolului și a propilenglicolului drept cosolvenți în siropurile și soluțiile orale cu paracetamol.

Aplicații în industria farmaceutică

Aproximativ 40 % dintre medicamentele comercializate și o proporție mult mai mare dintre candidații aflați în dezvoltare au solubilitate apoasă redusă. De aceea, preformularea dispune de un set de strategii tehnologice de creștere a solubilității sau a vitezei de dizolvare:

Strategie	Principiu	Exemplu
Formarea unei sări	ionizarea crește interacțiunea cu apa	diclofenac sodic, sertralină clorhidrat
Cosolvenți	scăderea polarității vehiculului	etanol și propilenglicol în siropurile cu paracetamol
Surfactanți	solubilizare micelară	polisorbat 80 în soluții injectabile
Complexare	includere în cavitatea unei ciclodextrine	itraconazol cu hidroxipropil-β-ciclodextrină
Nanocristale	creșterea suprafeței specifice	fenofibrat nanocristalin
Dispersii solide amorfe	eliminarea energiei rețelei cristaline	lopinavir/ritonavir în matrice polimerică

Pentru acizii și bazele slabe, solubilitatea totală depinde de pH. Pentru un acid slab, cu solubilitatea intrinsecă S_0 (forma neionizată):

$S = S_0 \cdot (1 + 10^{(pH - pKa)})$ (acid slab) $S = S_0 \cdot (1 + 10^{(pKa - pH)})$ (bază slabă)

Surse frecvente de erori

- porțiunile de substanță nu sunt cântărite exact;
- agitarea este prea scurtă — se confundă viteza de dizolvare cu solubilitatea;
- temperatura variază între recipiente;
- evaporarea etanolului în timpul lucrului;
- suprasaturarea după încălzire, urmată de cristalizare la răcire.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — solubilitatea dependentă de pH

Naproxen: acid slab, pKa = 4,2; S_0 = 0,016 mg/mL; doză maximă 500 mg.

la pH 1,2: $S \approx S_0$ = 0,016 mg/mL; D_0 = (500/250) / 0,016 = 125

la pH 7,4: S = 0,016 × (1 + 10^3,2) = 0,016 × 1586 = 25,4 mg/mL; D_0 = 2 / 25,4 = 0,079

→ Naproxenul nu îndeplinește criteriul de solubilitate înaltă pe tot intervalul pH 1,2–6,8 (clasa BCS II), deși în intestin se dizolvă ușor.

EXEMPLUL 2 — alegerea vehiculului pentru un sirop

Sirop cu paracetamol 120 mg / 5 mL → 2,40 g în 100 mL. Solubilități: apă 1,4 g/100 mL; propilenglicol 11,1 g/100 mL; etanol 14,3 g/100 mL.

Vehicul: 70 % apă, 20 % propilenglicol, 10 % etanol (v/v). Estimare aditivă:

$S \approx 0{,}70 \times 1{,}4 + 0{,}20 \times 11{,}1 + 0{,}10 \times 14{,}3 = 0{,}98 + 2{,}22 + 1{,}43 = 4{,}63$ g/100 mL

→ 2,40 g/100 mL < 4,63 g/100 mL: substanța rămâne dizolvată, cu o marjă de siguranță pentru depozitarea la rece. Estimarea aditivă este orientativă; solubilitatea reală se determină experimental.

EXEMPLUL 3 — probabilitatea de succes în dezvoltarea clinică

Probabilități de medii de trecere: faza I → II 52 %; faza II → III 29 %; faza III → autorizare solicitată 58 %; solicitare → aprobare 90 %.

$P = 0{,}52 \times 0{,}29 \times 0{,}58 \times 0{,}90 = 0{,}079 \rightarrow 7{,}9\ \%$

→ Din 100 de molecule care intră în faza I, aproximativ 8 ajung pe piață; faza II este etapa cu cea mai mare atriție.

Întrebări

1. Care sunt criteriile de alegere a formei farmaceutice în faza de concepție?
2. Cum influențează solubilitatea alegerea formei farmaceutice și a excipienților?
3. Ce implicații GMP apar la trecerea de la formularea de laborator la producția industrială?
4. De ce este necesară validarea proceselor de fabricație?
5. Ce prevede sistemul de clasificare biofarmaceutică (BCS) pentru o substanță cu solubilitate redusă și permeabilitate mare?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Ibuprofen: acid slab, S_0 = 0,021 mg/mL, doză maximă 400 mg. Calculați D_0 la pH 1,2.
2. Pentru același ibuprofen (pKa = 4,4), calculați solubilitatea și D_0 la pH 6,8.
3. 0,25 g dintr-o substanță se dizolvă complet în 10 mL apă, iar 0,30 g nu se mai dizolvă. Încadrați substanța conform farmacopeii.
4. Ce volum minim de propilenglicol dizolvă 2,4 g paracetamol (1 g în 9 mL)?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **O substanţă din clasa BCS II are:**
   a) solubilitate înaltă și permeabilitate înaltă
   b) solubilitate redusă și permeabilitate înaltă
   c) solubilitate înaltă și permeabilitate redusă
   d) solubilitate și permeabilitate reduse
2. **Termenul „ușor solubil" înseamnă că 1 g se dizolvă în:**
   a) mai puțin de 1 mL
   b) 1–10 mL
   c) 10–30 mL
   d) 30–100 mL
3. **Solubilitatea unui acid slab crește când pH-ul:**
   a) scade sub pKa
   b) crește peste pKa
   c) este egal cu pKa
   d) solubilitatea nu depinde de pH
4. **Cerințele GMP se aplică fabricației medicamentului începând cu:**
   a) screeningul compușilor
   b) loturile pentru studii clinice
   c) doar producția comercială
   d) doar produsele sterile

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 3

Materii prime în industria farmaceutică: umiditate, apă purificată, control de pH

Manual: *Capitolul 3 — Materii prime, reactivi și solvenți utilizați în industria farmaceutică*

Obiective

- determinarea pierderii la uscare a unei materii prime solide;
- verificarea unor parametri ai apei purificate (pH, conductivitate);
- trasarea curbei de neutralizare a acidului citric cu NaOH și calculul purității.

Noțiuni teoretice

Apa este, prin volum, cea mai utilizată materie primă din industria farmaceutică. Farmacopeea Europeană prevede monografii distincte pentru apa purificată (0008), apa pentru preparate injectabile (0169) și apa pentru prepararea extractelor (2249). Apa purificată se obține din apă potabilă prin prefiltrare, dedurizare, filtrare pe cărbune activ, osmoză inversă și electrodeionizare; apa pentru preparate injectabile se obține prin distilare sau, din 2017, și prin osmoză inversă cuplată cu tehnici suplimentare.

Parametru	Apă purificată	Apă pentru preparate injectabile
Conductivitate	≤ 5,1 µS/cm (25 °C)	≤ 1,1 µS/cm (20 °C)
Carbon organic total	≤ 0,5 mg/L	≤ 0,5 mg/L
Endotoxine bacteriene	—	< 0,25 UI/mL
Contaminare microbiană (limită de acțiune)	100 UFC/mL	10 UFC/100 mL

Umiditatea materiilor prime solide influențează curgerea pulberilor, compresibilitatea, stabilitatea chimică (hidroliză) și creșterea microbiană. Controlul pH-ului este o operație curentă în fabricație: acidul citric și sărurile sale formează sisteme tampon utilizate în soluții orale, injectabile și oftalmice.

PRECIZARE

Farmacopeea nu mai impune o limită de pH pentru apa purificată; calitatea ionică se controlează prin conductivitate. Apa proaspăt purificată, lăsată în contact cu aerul, absoarbe CO_2 și are un pH ușor acid (aproximativ 5,5–6).

Acidul citric este triprotic (pKa ≈ 3,1; 4,8; 6,4). Constantele sunt apropiate, astfel încât curba de titrare nu prezintă trei salturi distincte, ci un singur punct de echivalență, în jurul pH-ului 8–8,5. Oprirea titrării la pH 7 nu corespunde neutralizării complete.

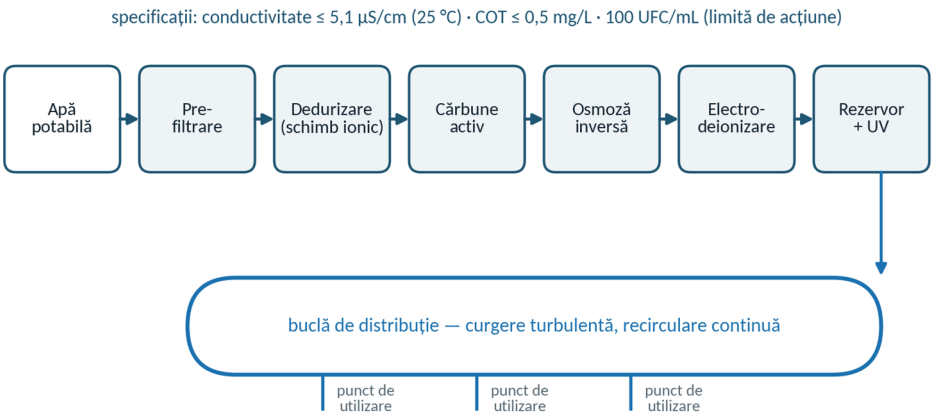


Figura 3.1. Schema unui sistem de obținere și distribuție a apei purificate.

Pierderea la uscare măsoară toate substanţele volatile în condiţiile testului (apă legată, apă de cristalizare, solvenți reziduali), în timp ce **titrarea Karl Fischer** măsoară specific apa. Pentru acidul citric monohidrat, farmacopeea specifică un conținut de apă de 7,5–9,0 %, determinat prin metoda Karl Fischer.

Capacitatea tampon a sistemului citrat este maximă la pH = pKa (ecuația Henderson–Hasselbalch). Deoarece cele trei constante sunt apropiate, sistemul tamponează pe un interval larg, de la pH ≈ 2,5 la pH ≈ 7 (figura 3.2), ceea ce explică utilizarea sa în forme lichide orale și parenterale.

$$pH = pKa + \lg([A^-] / [HA])$$

Reacție

$$C_6H_8O_7 + 3\ NaOH \rightarrow Na_3C_6H_5O_7 + 3\ H_2O$$

Materiale și reactivi

- acid citric monohidrat (≥ 99 %, M = 210,14 g/mol);
- soluție NaOH 0,1 M (factor cunoscut);
- apă purificată; soluții tampon pH 4, 7, 10 pentru calibrare;
- fenolftaleină 1 % (opțional);
- pH-metru (sau benzi indicatoare), conductometru (opțional);
- capsulă de porțelan sau fiolă de cântărire, etuvă (105 °C), exsicator, cântar analitic;
- pahare Berzelius de 50–100 mL, biuretă de 50 mL, agitator magnetic, spatulă, termometru.

Protecția muncii

- halat, mănuși, ochelari;
- NaOH este coroziv — se evită contactul cu pielea și ochii;
- acidul citric poate irita mucoasele;
- capsulele scoase din etuvă se manipulează cu clește.

Mod de lucru

1. Pierderea la uscare a acidului citric

1. Se usucă o capsulă de porțelan la 105 °C, se răcește în exsicator și se tarează (m_0).
2. Se cântăresc în capsulă aproximativ 2 g acid citric monohidrat (m_1).
3. Se usucă la 105 °C timp de 1 oră, se răcește în exsicator 10 minute și se cântărește.
4. Se repetă uscarea până la masă constantă (diferență între două cântăriri < 0,5 mg) — m_2.

2. pH-ul și conductivitatea apei purificate

1. Se calibrează pH-metrul cu soluțiile tampon pH 4, 7 și 10.
2. Se măsoară pH-ul pentru 20–30 mL apă purificată proaspăt prelevată și pentru o probă lăsată 30 minute în pahar deschis.
3. Opțional: se măsoară conductivitatea celor două probe și se compară cu limita farmacopeică.

3. Curba de neutralizare a acidului citric

1. Se cântăresc exact aproximativ 0,210 g acid citric monohidrat (≈ 1,00 mmol) și se dizolvă în 20 mL apă purificată.
2. Se introduce electrodul pH-metrului și se pornește agitarea.
3. Se adaugă din biuretă NaOH 0,1 M câte 2 mL, iar în apropierea punctului de echivalență (după 26 mL) câte 0,5 mL; după fiecare adaos se notează pH-ul.
4. Se continuă până la pH ≈ 11. Se notează volumul la echivalență (punctul de inflexiune; dacă se folosește fenolftaleină, virajul la roz pal persistent).
5. Se observă aspectul soluției și ușoara încălzire a acesteia.

Calcule

$$\text{Pierdere la uscare (\%)} = (m_1 - m_2) \times 100 \,/\, (m_1 - m_0)$$

$$\text{Puritate (\%)} = V(\text{NaOH, mL}) \times c(\text{NaOH, mol/L}) \times 210{,}14 \times 100 \,/\, (3 \times m \text{ probă, mg})$$

Conținutul teoretic de apă de cristalizare al acidului citric monohidrat este 18,02 / 210,14 = 8,57 %; volumul teoretic de NaOH 0,1 M pentru 1,00 mmol acid citric este 30,0 mL.

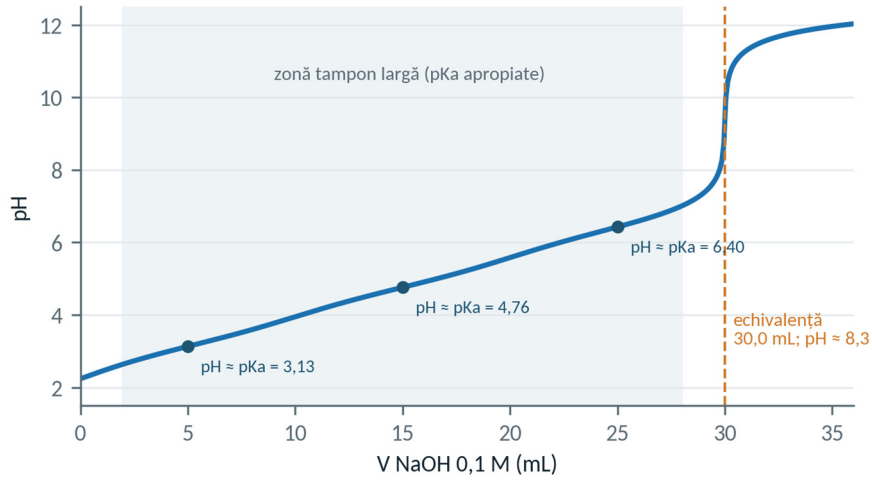


Figura 3.2. Curba teoretică de titrare a 1,00 mmol acid citric cu NaOH 0,1 M (calculată cu pKa = 3,13; 4,76; 6,40).

EXEMPLU DE CALCUL — pierderea la uscare

m_0 = 25,1234 g; m_1 = 27,1234 g (proba = 2,0000 g); m_2 = 26,9534 g (masă constantă)

Pierdere la uscare = (27,1234 − 26,9534) × 100 / 2,0000 = 0,1700 × 100 / 2,0000 = 8,50 %

→ Valoare apropiată de conținutul teoretic de apă de cristalizare (8,57 %) și în intervalul 7,5–9,0 %.

EXEMPLU DE CALCUL — puritatea acidului citric

m probă = 210,5 mg; V NaOH la echivalență = 29,85 mL; c NaOH = 0,1000 M (factor 1,000)

n NaOH = 29,85 × 0,1000 = 2,985 mmol; n acid citric = 2,985 / 3 = 0,995 mmol

m acid citric = 0,995 × 210,14 = 209,1 mg; puritate = 209,1 × 100 / 210,5 = 99,3 %

Tampon citrat: la adăugarea a 15 mL NaOH, raportul dintre formele H_2Cit^- și $HCit^{2-}$ este aproximativ 1 : 1, iar pH ≈ pKa_2 = 4,76.

Rezultate

m_0 (g)	m_1 (g)	m_2 (g)	Pierdere la uscare (%)	Observații

Probă de apă	pH	Conductivitate (µS/cm)	Conform / neconform
Proaspăt prelevată			
După 30 min în aer			

V NaOH (mL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
pH										

V NaOH (mL)	20	22	24	26	27	28	29	30	31	32
pH										

Se reprezintă grafic pH = f(V NaOH) și se marchează punctul de echivalență și zona de tamponare.

Aplicații în industria farmaceutică

Un sistem de apă farmaceutică este calificat înainte de utilizare și monitorizat continuu. Calificarea de performanță se desfășoară, de regulă, în trei faze: o fază intensivă de 2–4 săptămâni, cu prelevare zilnică din toate punctele; o a doua fază de 2–4 săptămâni, după stabilirea procedurilor; și o a treia fază de un an, care surprinde variația sezonieră a apei de alimentare.

Soluțiile tampon sunt alese după pKa, după compatibilitatea cu substanța activă și după calea de administrare:

Sistem tampon	pKa (25 °C)	Interval util	Utilizare
Acetat	4,76	3,8–5,8	soluții injectabile, oftalmice
Citrat	3,13; 4,76; 6,40	2,5–7,0	forme orale lichide, anticorpi monoclonali
Fosfat	7,21	6,2–8,2	injectabile, oftalmice, tampoane de proces
Histidină	6,0	5,5–6,5	formulări de anticorpi monoclonali
Tris	8,1	7,1–9,1	procesare biotehnologică

Capacitatea tampon β arată cantitatea de acid sau bază tare (mol/L) necesară pentru a modifica pH-ul cu o unitate. Ea este maximă la pH = pKa, unde β max = 0,576 · C (C — concentrația totală a tamponului).

Surse frecvente de erori

- pH-metrul nu a fost calibrat sau electrodul nu a fost clătit între soluții;
- temperatura probei diferă de cea a tampoanelor de calibrare;
- proba de apă absoarbe CO_2 înainte de măsurare;
- substanța higroscopică absoarbe apă în timpul cântăririi;
- capsula nu a fost adusă la masă constantă;
- soluția de NaOH a absorbit CO_2 (carbonatare) — titrul scade.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — prepararea unui tampon acetat pH 5,0; 0,1 M

$$[A^-] / [HA] = 10^{(5,0 - 4,76)} = 10^{0,24} = 1,74$$

$$[A^-] = 0,1 \times 1,74 / 2,74 = 0,0635 \text{ M}; \quad [HA] = 0,1 - 0,0635 = 0,0365 \text{ M}$$

Pentru 1 L: acetat de sodiu trihidrat (M = 136,08) — 0,0635 × 136,08 = 8,64 g; acid acetic glacial (M = 60,05; ρ = 1,049 g/mL) — 0,0365 × 60,05 = 2,19 g, adică 2,09 mL.

→ Se dizolvă în aproximativ 900 mL apă purificată, se verifică pH-ul și se aduce la 1000 mL.

EXEMPLUL 2 — standardizarea soluției de NaOH

Se titrează 0,2042 g biftalat acid de potasiu (M = 204,22; reacționează 1 : 1) și se consumă 10,05 mL NaOH.

$$n = 0,2042 / 204,22 = 1,000 \text{ mmol}; \quad c \text{ NaOH} = 1,000 / 10,05 = 0,09950 \text{ M}; \quad \text{factor } f = 0,09950 / 0,1 = 0,995$$

EXEMPLUL 3 — capacitatea tampon

Tampon citrat sau fosfat 0,05 M, la pH = pKa:

$$\beta \text{ max} = 0,576 \times 0,05 = 0,0288 \text{ mol/(L} \cdot \text{unitate pH)}$$

→ Adăugarea a 2,9 mmol de acid tare la 1 L de tampon modifică pH-ul cu aproximativ 0,1 unități.

Întrebări

1. Ce rol are controlul pH-ului în fabricația farmaceutică (stabilitate, solubilitate, toleranță la administrare)?
2. De ce se usucă unele materii prime înainte de procesare?
3. Cum se deosebește apa purificată de apa pentru preparate injectabile (obținere, specificații)?
4. Ce efecte are umiditatea excesivă asupra formelor farmaceutice solide?
5. De ce apa farmaceutică nu se stochează, ci se produce continuu și circulă în buclă?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Ce raport $[HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-]$ este necesar pentru un tampon fosfat cu pH 7,4 (pKa = 7,21)?
2. O probă de 1,5000 g are, după uscare la masă constantă, 1,3785 g. Calculați pierderea la uscare.
3. O apă are conductivitatea 1,8 µS/cm la 25 °C. Este conformă ca apă purificată? Dar ca apă pentru preparate injectabile?
4. Ce volum teoretic de NaOH 0,1 M neutralizează complet 0,3152 g acid citric monohidrat?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Limita de conductivitate a apei purificate la 25 °C este:**
   a) 1,1 µS/cm
   b) 5,1 µS/cm
   c) 10 µS/cm
   d) 25 µS/cm
2. **Din 2017, apa pentru preparate injectabile se poate obține, pe lângă distilare, și prin:**
   a) schimb ionic simplu
   b) osmoză inversă cuplată cu tehnici suplimentare
   c) filtrare pe cărbune activ
   d) fierbere prelungită
3. **Capacitatea tampon este maximă când:**
   a) pH = 7
   b) pH = pKa
   c) pH = pKa + 2
   d) concentrația tamponului este minimă
4. **Pierderea la uscare măsoară:**
   a) numai apa
   b) toate substanțele volatile în condițiile testului
   c) numai solvenții organici
   d) numai apa de cristalizare

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 4

Operații unitare mecanice și termice: mărunțirea, cernerea, evaporarea

Manual: *Capitolul 4 — Procese fundamentale şi operaţii unitare în industria farmaceutică*

Obiective

- realizarea mărunţirii unei pulberi farmaceutice;
- determinarea distribuţiei granulometrice prin cernere analitică;
- evaporarea unei soluţii şi recuperarea substanţei dizolvate prin cristalizare.

Noțiuni teoretice

Operațiile unitare sunt etape de proces definite prin fenomenul fizic pe care îl exploatează, independent de produsul fabricat. Mărunțirea crește suprafața specifică a particulelor și, prin aceasta, viteza de dizolvare, uniformitatea amestecurilor și compresibilitatea. Cernerea separă particulele după dimensiune și permite caracterizarea distribuției granulometrice (Ph. Eur. 2.9.38 — cernere analitică). Evaporarea îndepărtează solventul prin transfer de căldură și stă la baza concentrării și cristalizării.

Efectul mărunțirii se înțelege prin **suprafața specifică** (aria raportată la masă). Pentru particule sferice de diametru d și densitate ρ, suprafața specifică crește invers proporțional cu diametrul: reducerea de zece ori a dimensiunii particulelor mărește de zece ori suprafața disponibilă pentru dizolvare (ecuația Noyes–Whitney).

$$S\ (cm^2/g) = 6 / (\rho \cdot d) \qquad dm/dt = D \cdot S \cdot (Cs - C) / h$$

Rezultatul cernerii se exprimă ca distribuție: masa reținută pe fiecare sită, raportată la masa totală, și fracția cumulată trecută (figura 4.1). Diametrul median d_{50} este dimensiunea sub care se află jumătate din masa pulberii.

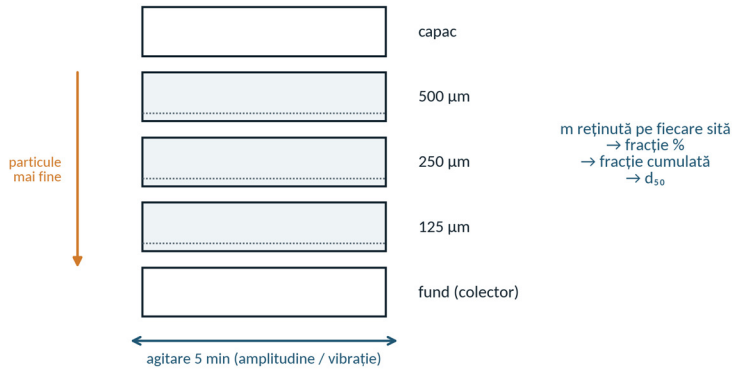


Figura 4.1. Setul de site pentru cernere analitică.

Principiul lucrării

O pulbere este mărunțită în mojar și trecută printr-o serie de site cu ochiuri descrescătoare. Masa reținută pe fiecare sită, raportată la masa totală, descrie distribuția granulometrică. Separat, o soluție de NaCl este concentrată prin încălzire până la cristalizare, iar sarea recuperată este cântărită.

Materiale și reactivi

- pulberi farmaceutice: lactoză, amidon sau talc;
- soluție de NaCl 10 % (m/V);
- mojar cu pistil;
- set de site standardizate (de exemplu 500 µm, 250 µm, 125 µm) cu capac și fund;
- agitator pentru site (sau agitare manuală), cântar analitic, hârtie de cântărire, pensulă;
- capsulă de porțelan tarată, placă de încălzire, baie de apă, termometru, cronometru.

Protecția muncii

- halat, ochelari și mască atunci când pulberile sunt fine sau iritante;
- se evită inhalarea pulberilor în timpul mărunțirii și al cernerii;
- placa de încălzire și capsula fierbinte prezintă risc de arsură; stropii de soluție concentrată sunt fierbinți.

Mod de lucru

1. Mărunțirea

1. Se introduc aproximativ 10 g pulbere în mojar.
2. Se mărunțește cu mișcări circulare, timp de 5 minute, până la o textură uniformă.
3. Se notează aspectul: granulație, omogenitate, tendință de aglomerare.

2. Cernerea analitică

1. Se cântăresc sitele și fundul goale.
2. Se asamblează sitele în ordinea descrescătoare a ochiurilor (cea mai mare deasupra), cu fundul la bază.
3. Se introduc pe sita superioară 5,00 g pulbere mărunțită; se pune capacul și se agită 5 minute.
4. Se cântăresc din nou sitele și fundul; se calculează masa reținută pe fiecare.
5. Se verifică bilanțul: suma maselor reținute trebuie să difere de masa inițială cu cel mult 5 %.

3. Evaporarea și cristalizarea

1. Se introduc 20,0 mL soluție NaCl 10 % într-o capsulă de porțelan tarată.
2. Se încălzește pe placă, fără fierbere violentă; se notează timpul și aspectul.
3. Când apar primele cristale, evaporarea se continuă pe baia de apă, pentru a evita stropirea.
4. Se usucă reziduul la 105 °C, se răcește în exsicator și se cântărește.

Calcule

Fracție reținută (%) = m reținută pe sită × 100 / m totală

Randament de recuperare NaCl (%) = m NaCl recuperată × 100 / 2,00 g

EXEMPLU DE CALCUL — distribuția granulometrică

Masa inițială 5,00 g. Mase reținute: 500 µm — 0,42 g; 250 µm — 1,38 g; 125 µm — 2,05 g; fund — 1,10 g. Total recuperat 4,95 g (bilanț 99,0 %, acceptabil).

Fracții (față de 4,95 g): 8,5 %; 27,9 %; 41,4 %; 22,2 %

Fracție cumulată trecută: < 125 µm = 22,2 %; < 250 µm = 63,6 %; < 500 µm = 91,5 %

$d_{50} = 125 + (50 - 22{,}2) / (63{,}6 - 22{,}2) \times (250 - 125) = 125 + 0{,}672 \times 125 = 209$ µm (interpolare liniară)

Suprafața specifică a lactozei ($\rho = 1{,}54$ g/cm^3): pentru d = 200 µm, $S = 6 / (1{,}54 \times 0{,}020) = 195$ cm^2/g; după micronizare la 20 µm, S = 1 948 cm^2/g — de zece ori mai mare.

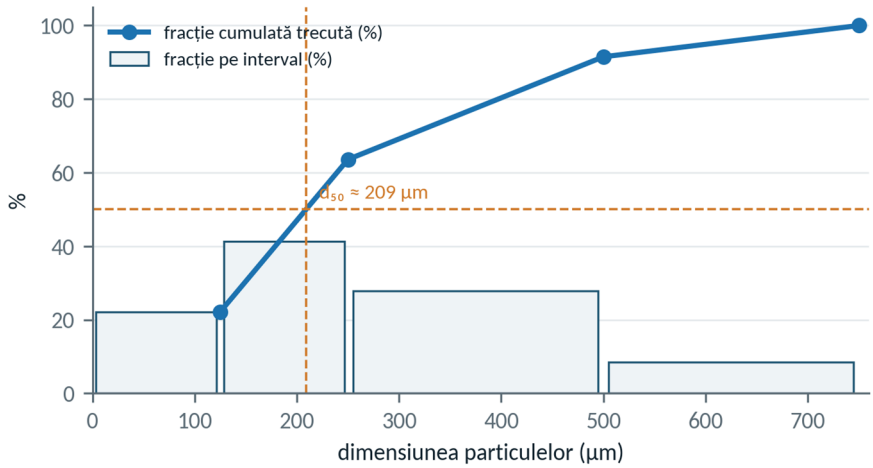


Figura 4.2. Distribuția granulometrică din exemplul de calcul și determinarea grafică a d_{50}.

EXEMPLU DE CALCUL — evaporarea

20,0 mL NaCl 10 % (m/V) conțin 2,00 g NaCl. După evaporare și uscare s-au recuperat 1,93 g.

Randament de recuperare = 1,93 × 100 / 2,00 = 96,5 %; pierderi = 0,07 g (3,5 %)

Rezultate

Sită (µm)	Masă reținută (g)	Fracție reținută (%)	Fracție cumulată trecută (%)
500			
250			
125			
Fund (< 125)			
Total			

Se reprezintă grafic fracția cumulată trecută în funcție de dimensiunea ochiului sitei și se estimează diametrul median (d_{50}).

Volum soluție (mL)	Timp de evaporare (min)	NaCl recuperată (g)	Randament (%)	Aspectul cristalelor
20,0				

Interpretare

- Pulberile mărunțite devin mai uniforme și au suprafață specifică mai mare.
- Granulometria influențează viteza de dizolvare, compresibilitatea și omogenitatea amestecurilor.
- Pierderile la recuperarea NaCl provin din stropire, din aderența la pereți și din umiditatea reziduală.

Aplicații în industria farmaceutică

Operație	Echipament industrial	Aplicație
Mărunțire grosieră	moară cu ciocane, moară conică	granule, materii prime vegetale
Micronizare (< 10 μm)	moară cu jet de aer	substanțe active slab solubile, pulberi de inhalat
Nanomăcinare	moară cu bile, umedă	nanocristale
Cernere	site vibratoare, site rotative	calibrarea granulelor, îndepărtarea aglomeratelor
Granulare	granulator cu forfecare mare, pat fluidizat, compactor cu valțuri	îmbunătățirea curgerii și a compresibilității
Uscare	pat fluidizat, etuvă cu tăvi, uscător prin pulverizare	granule, extracte
Evaporare	evaporator cu film descendent, evaporator rotativ	concentrarea extractelor și a soluțiilor

Curgerea pulberilor se caracterizează prin densitatea vrac (ρ vrac) și densitatea după tasare (ρ tasat) (Ph. Eur. 2.9.34 și 2.9.36):

Indice Carr (%) = (ρ tasat − ρ vrac) × 100 / ρ tasat Raport Hausner = ρ tasat / ρ vrac

Curgere	Indice Carr (%)	Raport Hausner
excelentă	≤ 10	1,00–1,11
bună	11–15	1,12–1,18
acceptabilă	16–20	1,19–1,25
tolerabilă	21–25	1,26–1,34
slabă	26–31	1,35–1,45
foarte slabă	32–37	1,46–1,59
extrem de slabă	> 38	> 1,60

Surse frecvente de erori

- pierderi de pulbere pe mojar, pe site și prin pulverizare în aer;
- site colmatate sau umede;
- agitare prea scurtă sau prea slabă;
- pulbere umedă, care formează aglomerate;
- stropirea soluției la evaporarea finală;
- reziduu insuficient uscat.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — curgerea unei pulberi

100 mL pulbere cântăresc 48 g (ρ vrac = 0,48 g/mL); după tasare, volumul scade la 77,4 mL (ρ tasat = 0,62 g/mL).

Indice Carr = (0,62 − 0,48) × 100 / 0,62 = 22,6 %; Hausner = 0,62 / 0,48 = 1,29

→ Curgere tolerabilă: pulberea necesită granulare sau un agent de curgere (dioxid de siliciu coloidal) înainte de comprimare directă.

EXEMPLUL 2 — suprafața specifică

Substanță activă cu ρ = 1,3 g/cm^3, particule de 50 µm (0,005 cm):

S = 6 / (1,3 × 0,005) = 923 cm^2/g; după micronizare la 5 µm: S = 9 230 cm^2/g

EXEMPLUL 3 — energia necesară evaporării

Se evaporă 20 g apă pornind de la 20 °C (c = 4,18 J/g·°C; căldura latentă de vaporizare 2 260 J/g):

Q = 20 × 4,18 × 80 + 20 × 2 260 = 6 688 + 45 200 = 51 888 J ≈ 51,9 kJ

cu o placă de 500 W și un randament de transfer de 60 %: t ≈ 51 888 / 300 = 173 s ≈ 2,9 min (valoare minimă teoretică)

→ Aproape 90 % din energie este consumată de vaporizare, nu de încălzire — de aceea evaporarea și uscarea sunt cele mai costisitoare energetic operații.

Întrebări

1. Cum influențează granulometria viteza de dizolvare a unei substanțe?
2. De ce este necesară standardizarea sitelor în industria farmaceutică?
3. Ce rol are evaporarea în concentrarea soluțiilor și în cristalizare?
4. Cum afectează umiditatea și higroscopicitatea operațiile mecanice?
5. De ce micronizarea unei substanțe active poate crește biodisponibilitatea, dar poate înrăutăți curgerea pulberii?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. La cernerea a 5,00 g pulbere se reține: 500 µm — 0,30 g; 250 µm — 1,10 g; 125 µm — 2,40 g; fund — 1,15 g. Calculați fracțiile și d_{50}.
2. ρ vrac = 0,55 g/mL; ρ tasat = 0,60 g/mL. Caracterizați curgerea.
3. Calculați suprafața specifică a unei pulberi cu ρ = 1,5 g/cm^3 și d = 10 µm.
4. Din 20,0 mL NaCl 10 % se recuperează 1,86 g NaCl. Calculați randamentul.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Micronizarea sub 10 µm se realizează de obicei în:**
   a) moară cu ciocane
   b) moară cu jet de aer
   c) mojar
   d) granulator
2. **Un raport Hausner de 1,40 indică o curgere:**
   a) excelentă
   b) bună
   c) slabă
   d) foarte bună
3. **Dacă diametrul particulelor scade de 5 ori, suprafața specifică:**
   a) scade de 5 ori
   b) crește de 5 ori
   c) crește de 25 de ori
   d) rămâne constantă
4. **d_{50} reprezintă:**
   a) dimensiunea maximă a particulelor
   b) dimensiunea sub care se află 50 % din masa pulberii
   c) 50 % din masa reținută pe prima sită
   d) media aritmetică a ochiurilor sitelor

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 5

Operații unitare de difuziune și separare: dializa și filtrarea sub vid

Manual: *Capitolul 4 — Procese fundamentale și operații unitare în industria farmaceutică*

Obiective

- observarea difuziei printr-o membrană semipermeabilă și a selectivității acesteia;
- separarea unui precipitat prin filtrare sub vid;
- calculul randamentului de separare.

Noțiuni teoretice

Difuziunea este transferul de masă determinat de un gradient de concentrație. Fluxul de substanță este proporțional cu gradientul (legea lui Fick) și depinde de temperatură, de dimensiunea moleculei, de natura solventului și de proprietățile membranei. Membranele de dializă (prag de separare de obicei 12–14 kDa) lasă să treacă moleculele mici și ionii, dar reține macromoleculele — principiu aplicat industrial în ultrafiltrare, diafiltrare și schimbul de tampon.

Filtrarea separă o fază solidă de una lichidă printr-un mediu poros. Aplicarea vidului crește diferența de presiune de o parte și de alta a filtrului și, deci, viteza de filtrare, ceea ce o face potrivită pentru suspensii dense și precipitate cristaline.

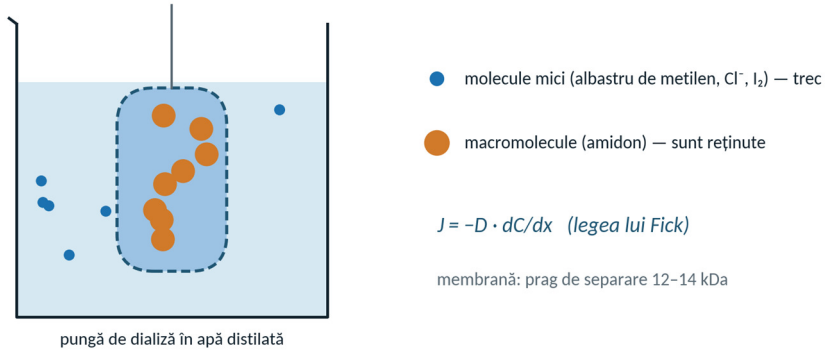


Figura 5.1. Principiul dializei: selectivitatea membranei după dimensiunea moleculară.

Viteza filtrării este descrisă de legea lui Darcy: debitul este proporțional cu diferența de presiune și cu aria filtrului și invers proporțional cu vâscozitatea lichidului și cu rezistența stratului de precipitat (turta) și a mediului filtrant. Vidul crește diferența de presiune până la aproximativ 0,8–0,9 bar (figura 5.2).

$$Q = A \cdot \Delta p \,/\, [\, \mu \cdot (R_{\text{turtă}} + R_{\text{mediu}}) \,]$$

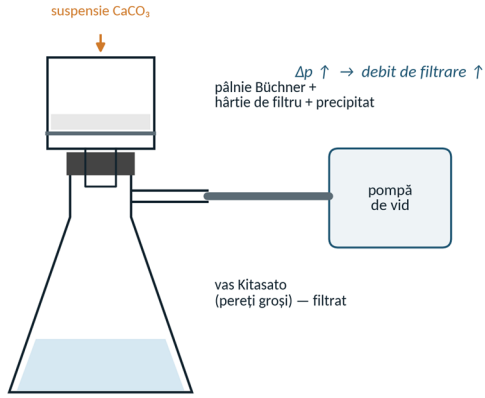


Figura 5.2. Montajul pentru filtrarea sub vid.

Reacție

$$CaCl_2 + Na_2CO_3 \rightarrow CaCO_3\downarrow + 2\ NaCl$$

Materiale și reactivi

- albastru de metilen, soluție 0,1 %;
- amidon, soluție 1 %, în care s-a dizolvat NaCl 1 %;
- soluție Lugol; soluție $AgNO_3$ 1 %;
- soluții $CaCl_2$ 0,5 M și Na_2CO_3 0,5 M;
- apă distilată;
- tub de membrană de dializă (12–14 kDa), cleşti sau aţă pentru închidere;
- pahare Berzelius de 100–250 mL, eprubete, pipete;
- pâlnie Büchner, vas Kitasato, pompă de vid, hârtie de filtru, etuvă, cântar analitic, cronometru.

Protecția muncii

- halat, mănuşi, ochelari;
- soluțiile colorate pătează — se manipulează cu atenție;
- $AgNO_3$ pătează pielea;
- instalația de vid se verifică înainte de utilizare (sticlărie fără fisuri, vas Kitasato cu pereți groşi).

Mod de lucru

1. Difuzia prin membrană

1. Se umectează două bucăţi de membrană de dializă şi se leagă la un capăt, sub formă de pungă.
2. Punga 1 se umple cu soluție de albastru de metilen; punga 2 cu soluție de amidon şi NaCl. Se închid şi se clătesc la exterior.

3. Fiecare pungă se introduce într-un pahar cu 100 mL apă distilată; se pornește cronometrul.
4. Pentru punga 1 se notează momentul apariției culorii în exterior și intensitatea ei la 5, 10, 20 și 30 de minute.
5. Pentru punga 2, după 20 de minute se prelevă două probe de câte 2 mL din apa exterioară: în prima se adaugă 2 picături Lugol (test pentru amidon), în a doua 2 picături $AgNO_3$ (test pentru cloruri).

2. Precipitarea și filtrarea sub vid a $CaCO_3$

1. Se amestecă într-un pahar 20,0 mL $CaCl_2$ 0,5 M cu 20,0 mL Na_2CO_3 0,5 M; se formează precipitatul de $CaCO_3$.
2. Se usucă și se cântărește o hârtie de filtru, care se așază apoi în pâlnia Büchner și se umectează.
3. Se pornește vidul și se filtrează suspensia; se cronometrează filtrarea.
4. Precipitatul se spală cu 2 × 5 mL apă rece.
5. Hârtia cu precipitat se usucă la 105 °C până la masă constantă și se cântărește.
6. Opțional: aceeași cantitate de suspensie se filtrează gravitațional și se compară timpii.

Calcule

Masa teoretică de $CaCO_3$: 0,010 mol × 100,09 g/mol = 1,00 g.

$$\text{Randament (\%)} = m\ CaCO_3 \text{ obținută} \times 100 / 1{,}00\ g$$

EXEMPLU DE CALCUL

Reactanți: 20,0 mL $CaCl_2$ 0,5 M = 10,0 mmol; 20,0 mL Na_2CO_3 0,5 M = 10,0 mmol (raport stoechiometric 1 : 1).

$$m \text{ teoretică } CaCO_3 = 10{,}0 \text{ mmol} \times 100{,}09 \text{ mg/mmol} = 1{,}001 \text{ g}$$

Hârtie de filtru uscată 0,812 g; hârtie + precipitat uscat 1,774 g → m $CaCO_3$ = 0,962 g.

$$\text{Randament} = 0{,}962 \times 100 / 1{,}001 = 96{,}1\ \%$$

Debit de filtrare: 40 mL în 45 s sub vid (0,89 mL/s) față de 40 mL în 6 min 30 s gravitațional (0,10 mL/s) — filtrarea sub vid este de aproape 9 ori mai rapidă.

Rezultate

Timp (min)	5	10	20	30
Intensitatea culorii în exterior (−, +, ++, +++)				

Probă din exteriorul pungii 2	Reactiv	Rezultat	Interpretare
Proba 1	Lugol		
Proba 2	$AgNO_3$		

Filtrare	Timp (s)	m $CaCO_3$ (g)	Randament (%)	Aspect filtrat
Sub vid				
Gravitațională				

Interpretare

- Albastrul de metilen (M ≈ 320 g/mol) și ionii Cl^- trec prin membrană; amidonul este reținut — membrana separă după dimensiunea moleculară.
- Precipitatul de $CaCO_3$ este practic insolubil și se separă eficient prin filtrare sub vid, mai rapid decât gravitațional.

Aplicații în industria farmaceutică

Operație	Principiu	Aplicație farmaceutică
Filtrare sterilizantă	membrană de 0,2–0,22 µm, reținere a bacteriilor	soluții injectabile termolabile, medii de cultură
Filtrare în adâncime	reținere în masa unui strat poros	clarificarea mediilor de cultură celulară
Ultrafiltrare / diafiltrare tangențială	membrane de 10–50 kDa, curgere paralelă cu membrana	concentrarea proteinelor și schimbul de tampon
Nanofiltrare virală	membrane de ≈ 20 nm	îndepărtarea virusurilor din produsele biologice
Dializă	difuzie prin membrană semipermeabilă	hemodializă; îndepărtarea sărurilor la scară de laborator
Centrifugare	sedimentare în câmp centrifug	recoltarea celulelor, separarea precipitatelor

Filtrele sterilizante se verifică prin **teste de integritate** înainte și după utilizare. Cel mai cunoscut este **punctul de bule** (bubble point): presiunea la care gazul forțează lichidul să iasă din porii cei mai mari ai membranei umectate. O valoare mai mică decât specificația indică o membrană deteriorată.

În diafiltrare se adaugă tampon nou cu aceeași viteză cu care se elimină permeatul. Un volum de diafiltrare (DV) este volumul de tampon egal cu volumul retentatului. Pentru o substanță mică, care trece liber prin membrană, fracția rămasă după N volume este:

$$C / C_0 = e^{(-N)}$$

Surse frecvente de erori

- membrana nu a fost umectată sau are fisuri;
- punga nu este închisă etanș și conținutul se scurge;
- hârtia de filtru nu acoperă complet orificiile pâlniei Büchner;
- pierderi de precipitat la transfer;
- precipitatul nu este uscat la masă constantă — randament fals crescut;
- vid întrerupt în timpul filtrării.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — diafiltrarea

Se îndepărtează sulfatul de amoniu dintr-o soluție de proteină prin diafiltrare la volum constant.

după 5 DV: C / C_0 = e^(−5) = 0,0067 → rămâne 0,67 % (se îndepărtează 99,3 %)

pentru 99,9 % îndepărtare: N = ln(1 000) = 6,9 DV

EXEMPLUL 2 — fluxul difuziv (legea lui Fick)

D = 5 × 10^{-6} cm^2/s; diferența de concentrație 1 mg/mL (1 mg/cm^3); grosimea membranei 50 µm (0,005 cm); aria 20 cm^2; timp 60 s.

$$J = 5 \times 10^{-6} \times 1 / 0{,}005 = 1{,}0 \times 10^{-3}\ mg/(cm^2 \cdot s)$$

m transferată = $1{,}0 \times 10^{-3} \times 20 \times 60 = 1{,}2$ mg

EXEMPLUL 3 — reactantul limitativ

Se amestecă 20,0 mL $CaCl_2$ 0,5 M (10,0 mmol) cu 15,0 mL Na_2CO_3 0,5 M (7,5 mmol).

Na_2CO_3 este limitativ: n $CaCO_3$ = 7,5 mmol; m teoretică = 7,5 × 100,09 = 751 mg

→ Excesul de Ca^{2+} rămâne în filtrat și poate fi evidențiat cu Na_2CO_3.

Întrebări

1. Ce factori influențează viteza de difuzie?
2. De ce este necesar vidul la filtrarea suspensiilor dense?
3. Ce aplicații industriale au dializa, ultrafiltrarea și filtrarea?
4. Prin ce diferă o membrană de dializă de o hârtie de filtru?
5. Cum se realizează, la scară industrială, schimbul de tampon al unei soluții de proteină?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. O filtrare sub vid durează 45 s la o diferență de presiune de 0,8 bar. Cât ar dura la 0,4 bar, dacă rezistența turtei rămâne constantă?

2. Câte volume de diafiltrare sunt necesare pentru îndepărtarea a 99 % dintr-o sare?
3. În exemplul 3 se obţin 0,705 g $CaCO_3$ uscat. Calculaţi randamentul.
4. Care dintre următoarele trec printr-o membrană de dializă de 12–14 kDa: glucoza, insulina (5,8 kDa), albumina (66 kDa), IgG (150 kDa)?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Filtrarea sterilizantă foloseşte membrane cu porii de:**
   a) 0,22 µm
   b) 2 µm
   c) 20 µm
   d) 0,22 mm
2. **O membrană de dializă de 12–14 kDa reţine:**
   a) ionii Cl^-
   b) glucoza
   c) amidonul
   d) albastrul de metilen
3. **Vidul creşte viteza de filtrare deoarece:**
   a) scade vâscozitatea
   b) creşte diferenţa de presiune
   c) scade rezistenţa turtei
   d) creşte temperatura
4. **Integritatea unui filtru sterilizant se verifică prin:**
   a) testul de dezagregare
   b) punctul de bule
   c) testul biuretului
   d) conductivitate

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 6

Sinteza chimică a unei substanțe medicamentoase: acidul acetilsalicilic

Manual: *Capitolul 5 — Sinteza chimică industrială a substanțelor medicamentoase*

Obiective

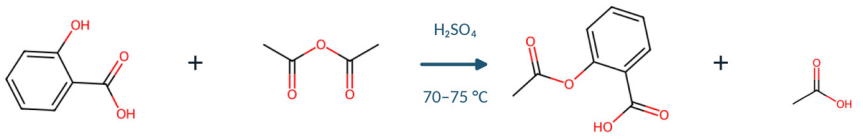
- sinteza acidului acetilsalicilic prin acetilarea acidului salicilic;
- izolarea şi purificarea produsului prin recristalizare;
- calculul randamentului şi controlul calităţii produsului obţinut.

Noțiuni teoretice

Sinteza industrială a aspirinei cuprinde două etape: obţinerea acidului salicilic prin reacţia Kolbe–Schmitt (carboxilarea fenoxidului de sodiu cu CO_2 sub presiune) şi acetilarea acidului salicilic cu anhidridă acetică, la temperaturi sub 90 °C, în prezenţa unui catalizator acid sau a unei amine terţiare. Performanţa unei sinteze se descrie prin randament, selectivitate şi puritate, iar impuritatea critică a produsului este acidul salicilic liber, provenit din reacţia incompletă sau din hidroliza esterului.

Principiul lucrării

Gruparea fenolică –OH a acidului salicilic este acetilată de anhidrida acetică, în prezenţa acidului sulfuric concentrat drept catalizator. Protonarea anhidridei creşte electrofilicitatea carbonilului, iar oxigenul fenolic atacă, formând legătura esterică (substituţie nucleofilă la carbonul acil). Se formează acid acetilsalicilic şi acid acetic. Randamentul depinde de raportul molar, de puritatea reactivilor, de temperatură, de timpul de reacţie şi de absenţa apei, care hidrolizează anhidrida.



acid salicilic
M = 138,12

anhidridă acetică
M = 102,09

acid acetilsalicilic
M = 180,16

acid acetic
M = 60,05

Figura 6.1. Acetilarea acidului salicilic cu anhidridă acetică.

Chimia verde evaluează o sinteză nu doar prin randament, ci şi prin eficienţa utilizării materiei. **Economia atomică** arată ce fracţie din masa reactanţilor ajunge, teoretic, în produs; **factorul E** raportează masa totală de deşeuri la masa de produs. Industria farmaceutică are factori E tipici de 25–100, mult mai mari decât chimia de bază.

Factor E = (masa totală a materialelor intrate − masa produsului) / masa produsului

Reacție

$$C_7H_6O_3 + (CH_3CO)_2O \rightarrow C_9H_8O_4 + CH_3COOH$$

acid salicilic + anhidridă acetică → acid acetilsalicilic + acid acetic

Materiale și reactivi (pentru aproximativ 5 g produs)

- acid salicilic (≥ 99 %) — 4,0 g (0,029 mol);
- anhidridă acetică (≥ 99 %) — 7,0 mL (≈ 7,6 g; 0,074 mol; aproximativ 2,5 echivalenți);
- acid sulfuric concentrat (95–98 %) — 4–5 picături (≈ 0,2 mL);
- apă purificată, gheață;
- etanol 96 % pentru recristalizare;
- clorură ferică 1 % pentru controlul calității;
- pahar Berzelius 100–150 mL, balon Erlenmeyer 250 mL, baghetă, baie de apă (70–75 °C), termometru;
- pâlnie Büchner, vas Kitasato, pompă de vid, hârtie de filtru, sticlă de ceas, etuvă sau exsicator, cântar analitic;
- aparat pentru punct de topire; plăci CCS (opțional).

PROTECȚIA MUNCII

Halat, ochelari, mănuși din nitril. Acidul sulfuric concentrat este coroziv și se adaugă picătură cu picătură. Anhidrida acetică este corozivă și lacrimogenă — se lucrează numai sub nișă. Amestecul de reacție nu se încălzește în vas închis ermetic.

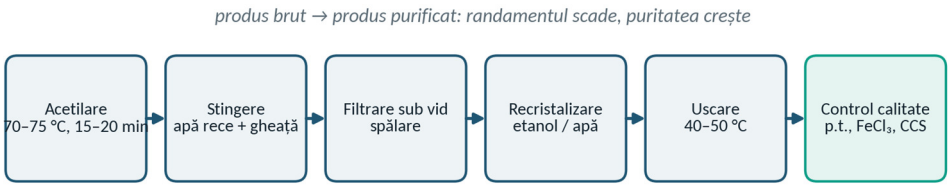


Figura 6.2. Succesiunea operațiilor în sinteza și purificarea acidului acetilsalicilic.

Mod de lucru

1. Sinteza (acetilarea)

1. Se cântăresc 4,0 g acid salicilic într-un pahar Berzelius uscat.
2. Sub nișă, se adaugă 7,0 mL anhidridă acetică și se amestecă până la o suspensie omogenă.
3. Se adaugă 4–5 picături de H_2SO_4 concentrat, amestecând ușor (reacție ușor exotermă).
4. Se încălzește pe baia de apă la 70–75 °C timp de 15–20 minute, cu amestecare continuă; suspensia se clarifică pe măsură ce reacția avansează.

5. Se scoate de pe baie și se adaugă lent 50–60 mL apă rece; se răcește pe gheață 10 minute — precipită cristalele de acid acetilsalicilic.

2. Izolarea

1. Precipitatul se filtrează sub vid pe pâlnia Büchner.
2. Se spală pe filtru cu 2 × 10 mL apă rece, pentru îndepărtarea acidului acetic și a anhidridei nereacționate.
3. Se menține câteva minute sub vid, pentru eliminarea apei.

3. Purificarea prin recristalizare

1. Solidul se trece într-un Erlenmeyer și se dizolvă în minimum de etanol 96 % cald (aproximativ 15–20 mL). Dacă rămân impurități insolubile sau colorate, se filtrează la cald.
2. Se adaugă lent 10–15 mL apă caldă, până la apariția opalescenței; se lasă să se răcească la temperatura camerei, apoi pe gheață 10–15 minute.
3. Cristalele albe se filtrează sub vid și se spală cu 2–3 mL etanol rece.
4. Se usucă la 40–50 °C sau în exsicator și se cântăresc.

4. Controlul calității

- Punct de topire: 134–136 °C pentru produsul pur; un interval mai larg sau mai coborât indică impurități.
- Test cu $FeCl_3$: câteva cristale se dizolvă în 1 mL etanol și se adaugă o picătură $FeCl_3$ 1 %. Se compară cu acidul salicilic (colorație violetă intensă) și cu un comprimat de aspirină din comerț. Coloraţia violetă indică acid salicilic liber.
- pH-ul unei soluții apoase 1 %: ușor acid.
- Opțional — cromatografie în strat subțire: eluent acetat de etil : hexan 1 : 1, cu acid salicilic și acid acetilsalicilic ca standarde.

Calcule

Masa teoretică: 0,029 mol × 180,16 g/mol = 5,22 g acid acetilsalicilic (acidul salicilic este reactantul limitativ).

$$\text{Randament (\%)} = \text{m produs uscat} \times 100 / 5{,}22\ \text{g}$$

$$\text{Economie atomică (\%)} = 180{,}16 \times 100 / (138{,}12 + 102{,}09) = 75{,}0\ \%$$

EXEMPLU DE CALCUL

Acid salicilic: 4,02 g / 138,12 g/mol = 29,1 mmol. Anhidridă acetică: 7,0 mL × 1,08 g/mL = 7,56 g / 102,09 = 74,1 mmol.

Raport molar anhidridă : acid salicilic = 74,1 / 29,1 = 2,5 → acidul salicilic este reactantul limitativ

m teoretică ASA = 29,1 mmol × 180,16 mg/mmol = 5,24 g

Produs brut uscat 4,60 g → randament brut 87,8 %; produs recristalizat 3,85 g → randament final 73,5 %.

Factor E (fără apă și etanol) = (4,02 + 7,56 + 0,37 − 3,85) / 3,85 = 8,10 / 3,85 = 2,1

→ Diferența dintre randamentul brut și cel final este prețul purității: acidul salicilic nereacționat și produsele secundare rămân în apele-mamă.

Rezultate

m brut (g)	m recristalizat (g)	Randament (%)	Punct de topire (°C)	Test $FeCl_3$	Aspect

Aplicații în industria farmaceutică

La trecerea sintezei din laborator în producție, atenția se mută de la randament la **controlul impurităților** și la **siguranța procesului**. Acetilarea este exotermă: la scară industrială, anhidrida se adaugă dozat, cu monitorizarea temperaturii, iar calorimetria de reacție stabilește viteza maximă de adăugare.

Impuritățile organice sunt reglementate prin ghidul ICH Q3A. Pentru o doză zilnică maximă ≤ 2 g, pragurile sunt: raportare 0,05 %; identificare 0,10 %; calificare toxicologică 0,15 %. Solvenții reziduali sunt reglementați prin ICH Q3C:

Clasa ICH Q3C	Caracteristică	Exemple și limite
Clasa 1	de evitat (cancerigeni, toxici pentru mediu)	benzen (2 ppm), tetraclorură de carbon (4 ppm)
Clasa 2	de limitat (toxicitate inerentă)	metanol 3 000 ppm; diclormetan 600 ppm; acetonitril 410 ppm
Clasa 3	toxicitate redusă	etanol, acetonă, acetat de etil — 5 000 ppm (0,5 %)

Surse frecvente de erori

- reactivi umezi sau sticlărie udă — anhidrida acetică se hidrolizează;
- încălzire peste 80 °C — produși secundari, colorare;
- răcire insuficientă înainte de filtrare — pierderi în apele-mamă;
- prea mult solvent la recristalizare — randament mic;

- produs incomplet uscat — randament aparent peste 100 %;
- hidroliza produsului prin spălare cu apă caldă.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — randamentul cu alte cantități

5,00 g acid salicilic (36,2 mmol) și 6,0 mL anhidridă acetică (6,48 g; 63,5 mmol). Se obțin 5,10 g produs uscat.

m teoretică = 36,2 × 180,16 = 6,52 g; randament = 5,10 × 100 / 6,52 = 78,2 %

EXEMPLUL 2 — solvenți reziduali

Analiza gaz-cromatografică arată 0,35 % etanol într-o serie și 0,42 % metanol în alta.

0,35 % = 3 500 ppm etanol < 5 000 ppm (clasa 3) → conform

0,42 % = 4 200 ppm metanol > 3 000 ppm (clasa 2) → neconform

EXEMPLUL 3 — economia atomică a sintezei paracetamolului

4-Aminofenol (109,13) + anhidridă acetică (102,09) → paracetamol (151,16) + acid acetic

EA = 151,16 × 100 / (109,13 + 102,09) = 71,6 %

Întrebări

1. Care este rolul acidului sulfuric în reacţie?
2. De ce se utilizează anhidrida acetică în exces şi de ce trebuie evitată apa?
3. Ce indică o coloraţie violetă la testul cu $FeCl_3$?
4. Ce diferenţă există între randament şi economie atomică? Cum se aplică principiile chimiei verzi acestei sinteze?
5. De ce recristalizarea scade randamentul, dar este obligatorie?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Din 3,50 g acid salicilic se obțin 3,60 g acid acetilsalicilic. Calculaţi randamentul.
2. O impuritate necunoscută este prezentă în proporţie de 0,12 %, iar doza zilnică maximă este 1 g. Ce obligații rezultă conform ICH Q3A?
3. Materialele intrate (fără apă și etanol) cântăresc 11,95 g, iar produsul final 3,20 g. Calculaţi factorul E.
4. Calculaţi raportul molar anhidridă : acid salicilic pentru 4,0 g acid salicilic și 5,0 mL anhidridă acetică (ρ = 1,08 g/mL).

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Rolul acidului sulfuric în acetilarea acidului salicilic este de:**
   a) solvent
   b) catalizator
   c) agent de uscare
   d) reactant stoechiometric
2. **Coloraţia violetă cu $FeCl_3$ indică:**
   a) acid acetic
   b) acid salicilic liber (grupare fenolică)
   c) anhidridă acetică
   d) acid sulfuric
3. **Etanolul este solvent din clasa ICH Q3C:**
   a) 1
   b) 2
   c) 3
   d) nu este clasificat
4. **Un randament de peste 100 % indică, cel mai probabil:**
   a) o sinteză foarte eficientă
   b) un produs incomplet uscat sau impur
   c) o eroare de citire a termometrului
   d) exces de catalizator

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 7

Fermentația alcoolică cu Saccharomyces cerevisiae

Manual: *Capitolul 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice*

Obiective

- urmărirea cineticii fermentației alcoolice prin volumul de CO_2 degajat;
- confirmarea CO_2 și estimarea stoechiometrică a etanolului format;
- compararea probei cu martori și cu variante de temperatură sau de substrat.

Noțiuni teoretice

Fermentația este procesul biotehnologic prin care microorganismele transformă un substrat într-un produs util. Drojdiile sunt organisme eucariote folosite atât în fermentațiile tradiționale, cât și ca gazde pentru proteine recombinante (de exemplu insulina și antigenul de suprafață al virusului hepatitei B). Viteza unei fermentații depinde de tulpină, de temperatură, de pH, de concentrația substratului și de disponibilitatea nutrienților.

Principiul lucrării

În condiții anaerobe, Saccharomyces cerevisiae degradează glucoza prin glicoliză până la piruvat. Piruvatul este decarboxilat la acetaldehidă, iar aceasta este redusă la etanol de alcool-dehidrogenază; reacția regenerează NAD^+, permițând continuarea glicolizei. CO_2 eliberat este un indicator al vitezei procesului.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 \quad (\approx 2\ ATP\ /\ glucoză)$$

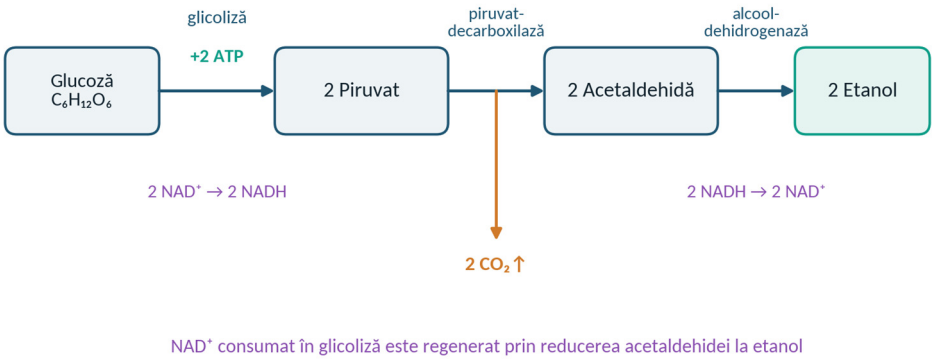


Figura 7.1. Fermentația alcoolică: glicoliza și regenerarea NAD^+.

Stoechiometric, 1 g glucoză poate produce cel mult 0,511 g etanol și 0,489 g CO_2 (randamentul Gay-Lussac). În practică, randamentul industrial este de 90–95 % din valoarea teoretică, deoarece o parte a substratului este folosită pentru biomasă și produși secundari (glicerol, acizi organici).

$$Y\ etanol/glucoză\ teoretic = 2 \times 46{,}07\ /\ 180{,}16 = 0{,}511\ g/g$$

Materiale și reactivi

- drojdie de panificație uscată activă (sau presată);
- glucoză anhidră (zaharoză, pentru comparație);
- apă purificată caldă (35–40 °C);
- opțional: tampon fosfat pH 5,0–5,5; sulfat de amoniu ca sursă de azot;
- lapte de var — $Ca(OH)_2$ — pentru confirmarea CO_2;
- 2–4 baloane Erlenmeyer de 250 mL, dopuri de cauciuc cu tub de legătură, baloane de cauciuc;
- cilindru gradat de 100 mL, cuvă cu apă (pentru colectarea gazului prin deplasare) sau seringă de gaz;
- baie de apă termostatată (30–37 °C), termometru, cronometru, benzi de pH.

Protecția muncii

- halat, mănuși, ochelari;
- se lucrează curat, pentru a evita contaminările;
- deșeurile sunt nepatogene și se colectează ca deșeuri biologice.

Mod de lucru

1. Suspensia de drojdie: 1,0 g drojdie se hidratează în 10 mL apă la 35–40 °C, 5 minute, apoi se omogenizează.
2. Soluția de glucoză 10 % (m/V): 10 g glucoză în 100 mL apă caldă, adusă la 35–37 °C (opțional tamponată la pH 5,2, cu 0,1 g sulfat de amoniu).
3. Proba: într-un Erlenmeyer se introduc 50 mL soluție de glucoză și 5 mL suspensie de drojdie; se montează dopul cu tubul de colectare.
4. Martorii: M1 — soluție de glucoză fără drojdie; M2 — glucoză cu drojdie inactivată prin fierbere (5 minute).
5. Se incubează la 35 °C și se pornește cronometrul.
6. Se citește volumul de CO_2 colectat prin deplasarea apei într-un cilindru gradat inversat, la fiecare 5 minute, timp de 30–45 de minute (alternativ, se măsoară circumferința balonului).
7. Se măsoară pH-ul la început și la sfârșit.
8. Confirmarea CO_2: gazul se barbotează prin lapte de var; apariția turbidității ($CaCO_3$) confirmă CO_2.

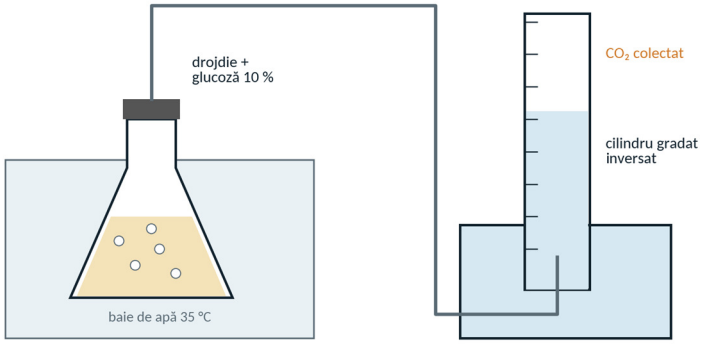


Figura 7.2. Montajul pentru măsurarea CO_2 prin deplasarea apei.

Calcule

$$n\ CO_2\ (mol) \approx V\ CO_2\ (mL) / 24\ 000 \quad (la \approx 25\ °C \text{ și } 1\ atm)$$

$$n\ etanol \approx n\ CO_2;\quad m\ etanol\ (g) = n \times 46{,}07$$

Rezultatul se exprimă în g etanol / L mediu. O parte din CO_2 rămâne dizolvată în mediu, astfel încât valoarea calculată este o estimare minimă.

EXEMPLU DE CALCUL

Volumul total de CO_2 colectat în 45 de minute: 145 mL (la ≈ 25 °C).

$n\ CO_2 = 145 / 24\ 000 = 6{,}04 \times 10^{-3}$ mol = 6,04 mmol → n etanol = 6,04 mmol

m etanol = 6,04 × 46,07 = 278 mg; în 55 mL mediu: 278 / 0,055 = 5,06 g/L

V etanol = 0,278 / 0,789 = 0,352 mL → 0,352 × 100 / 55 = 0,64 % (v/v)

glucoză consumată = 6,04 / 2 = 3,02 mmol × 180,16 = 0,544 g din 5,00 g → conversie 10,9 %

Viteza maximă (panta porțiunii liniare, 15–30 min): (117 − 32) mL / 15 min = 5,7 mL CO_2/min.

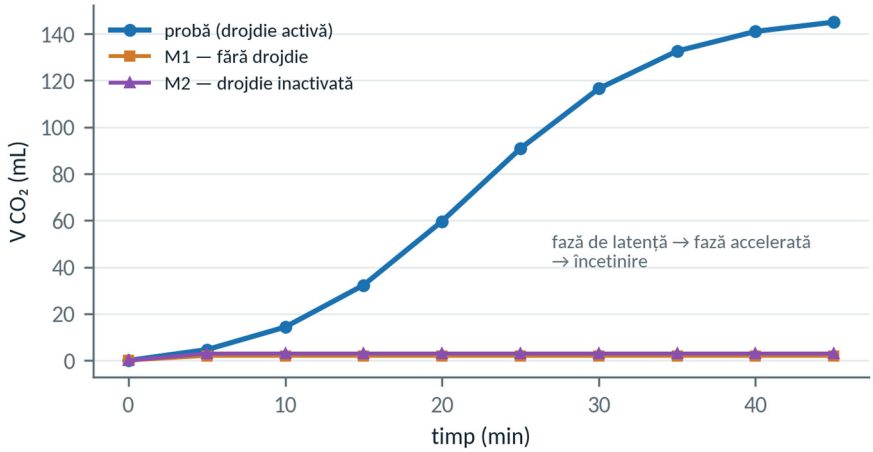


Figura 7.3. Evoluția volumului de CO_2 în probă și în martori (date ilustrative, corespunzătoare exemplului de calcul).

Rezultate

Timp (min)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
V CO_2 probă (mL)										
V CO_2 M1 (mL)										
V CO_2 M2 (mL)										

Se reprezintă grafic V CO_2 în funcție de timp pentru probă și martori. Pentru comparații, fiecare grupă poate modifica o singură variabilă: temperatura (20, 30, 37 °C), tipul zahărului (glucoză, zaharoză, maltoză), concentrația (2, 5, 10 %) sau pH-ul (4,5 față de 6,0).

Fermentația alcoolică și fermentația lactică

Caracteristică	Fermentație alcoolică (drojdii)	Fermentație lactică (bacterii lactice)
Acceptorul final de electroni	acetaldehida → etanol	piruvatul → lactat
Produși principali	etanol + CO_2	acid lactic
Formare de CO_2	da, abundentă	nu (homolactică); redusă (heterolactică)
pH-ul mediului	scade moderat	scade pronunțat
Organisme tipice	Saccharomyces cerevisiae	Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus thermophilus
Randament energetic	≈ 2 ATP / glucoză	≈ 2 ATP / glucoză
Utilizări	bere, vin, bioetanol, biomasă de drojdie	produse lactate fermentate, probiotice, acid lactic

Recomandări de bună practică

- se menține anaerobioza: vasul se umple parțial și nu se agită excesiv după montare;
- temperatura optimă pentru drojdie este 30–35 °C; peste 40 °C enzimele se inactivează;
- la final sticlăria se spală și se dezinfectează.

Aplicații în industria farmaceutică

Produs	Organism de producție	Observații
Insulină umană recombinantă	Saccharomyces cerevisiae; Escherichia coli	precursor secretat în drojdie, maturat enzimatic
Antigen de suprafață al virusului hepatitei B	S. cerevisiae	primul vaccin recombinant (1986)
Proteine de uz terapeutic	Komagataella (Pichia) pastoris	promotor inductibil cu metanol
Biomasă de drojdie, extract de drojdie	S. cerevisiae	medii de cultură, suplimente
Etanol	S. cerevisiae	solvent și materie primă farmaceutică

Creșterea microbiană în faza exponențială urmează o lege exponențială; viteza specifică de creștere μ depinde de concentrația substratului limitativ după ecuația lui Monod:

$$N = N_0 \cdot e^{(\mu \cdot t)} \qquad t\,d = \ln 2 / \mu \qquad \mu = \mu\,max \cdot S / (K\,s + S)$$

Randamentul de biomasă Y X/S (g biomasă/g substrat) este aproximativ 0,5 g/g în creștere aerobă pe glucoză și numai 0,05–0,1 g/g în fermentație — altă consecință a diferenței de randament energetic.

Surse frecvente de erori

- scurgeri de gaz pe la dop sau pe la îmbinări;
- drojdie neactivată sau inactivată de apă prea caldă (> 45 °C);
- temperatura băii variază;
- citirea volumului fără egalizarea nivelurilor de apă;
- neglijarea CO_2 dizolvat în mediu.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — timpul de dublare

O cultură de drojdie crește cu $\mu = 0{,}35\ h^{-1}$, pornind de la 1×10^6 celule/mL.

$t_d = 0{,}693 / 0{,}35 = 1{,}98$ h; după 6 h: $N = 1 \times 10^6 \times e^{(0{,}35 \times 6)} = 1 \times 10^6 \times e^{2{,}1} = 8{,}2 \times 10^6$ celule/mL

EXEMPLUL 2 — concentrația maximă de etanol

Mediu cu 100 g/L glucoză, randament de proces 92 % din valoarea teoretică:

etanol = $100 \times 0{,}511 \times 0{,}92 = 47{,}0$ g/L; $47{,}0 / 0{,}789 = 59{,}6$ mL/L → 5,96 % (v/v)

EXEMPLUL 3 — ecuația lui Monod

$\mu_{max} = 0{,}45\ h^{-1}$; $K_s = 0{,}2$ g/L; $S = 1{,}0$ g/L.

$$\mu = 0{,}45 \times 1{,}0 / (0{,}2 + 1{,}0) = 0{,}375\ h^{-1}$$

→ La S = 1 g/L cultura crește cu 83 % din viteza maximă; la S = 0,2 g/L (= K_s) ar crește cu jumătate din viteza maximă.

Întrebări

1. De ce este necesară regenerarea NAD^+ în fermentație?
2. Cum influențează temperatura și concentrația glucozei viteza fermentației?
3. De ce valoarea etanolului calculată din CO_2 este subestimată?
4. Ce rol au martorii M1 și M2?
5. Ce medicamente se obțin astăzi prin fermentație cu drojdii?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Ce volum de CO_2 (25 °C) se formează la fermentarea completă a 5,00 g glucoză?
2. O cultură crește de la 2×10^6 la $3{,}2 \times 10^7$ celule/mL în 8 h. Calculați μ și t_d.
3. S-au colectat 250 mL CO_2. Câte grame de etanol s-au format?
4. Se consumă 18 g/L glucoză cu $Y_{X/S} = 0{,}5$ g/g. Ce concentrație de biomasă se obține?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Enzima care eliberează CO_2 în fermentația alcoolică este:**
   a) alcool-dehidrogenaza
   b) piruvat-decarboxilaza
   c) hexokinaza
   d) lactat-dehidrogenaza
2. **Randamentul teoretic maxim etanol/glucoză este:**
   a) 0,25 g/g
   b) 0,511 g/g
   c) 1,0 g/g
   d) 2 mol/mol exprimat în g/g
3. **Martorul cu drojdie inactivată termic demonstrează că:**
   a) glucoza se descompune spontan
   b) CO_2 provine din activitatea celulelor vii
   c) temperatura nu contează
   d) drojdia nu conține enzime
4. **Temperatura optimă pentru fermentația cu *S. cerevisiae* este:**
   a) 4–10 °C
   b) 30–35 °C
   c) 50–55 °C
   d) 70 °C

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 8

Metabolismul aerob și anaerob al drojdiilor. Rolul oxigenului în fermentații

Manual: *Capitolul 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice (9.6. Transferul de oxigen)*

Obiective

- compararea activității drojdiei în condiții aerobe și anaerobe;
- înțelegerea rolului oxigenului în metabolismul energetic și în bioprocese;
- interpretarea efectului Crabtree.

Noțiuni teoretice

Oxigenul este mărimea limitantă a fermentațiilor aerobe industriale: solubilitatea sa în apă este mică, iar necesarul culturilor dense este mare. Din acest motiv, aerarea și agitarea bioreactorului, exprimate prin coeficientul volumetric de transfer de oxigen (kLa), sunt parametri critici de proces. În fermentația penicilinei, de exemplu, oxigenul dizolvat trebuie menținut peste 40 % din saturație.

Transferul de oxigen din bulele de aer în lichid este descris de ecuația vitezei de transfer (OTR). C* este concentrația de saturație (≈ 7 mg/L în apă la 35 °C, sub aer), iar C este concentrația oxigenului dizolvat. kLa crește cu turația agitatorului, cu debitul de aer și cu fragmentarea bulelor (figura 8.1). La echilibru, OTR trebuie să egaleze viteza de consum a oxigenului de către cultură (OUR).

$$OTR = kLa \cdot (C^* - C) \qquad OUR = q\,O_2 \cdot X$$

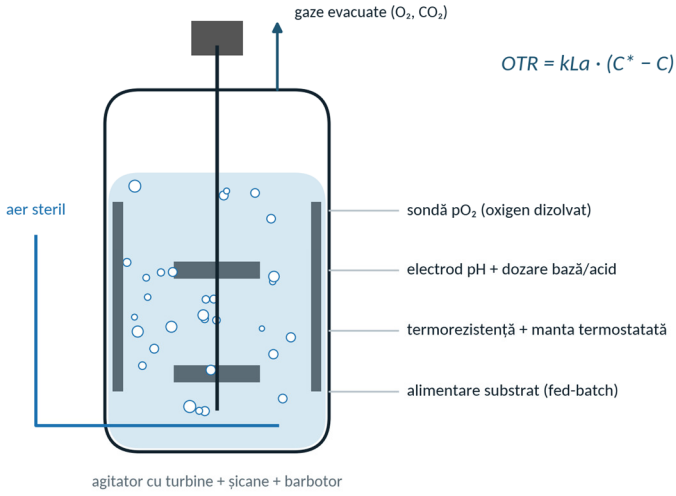


Figura 8.1. Elementele unui bioreactor aerob cu agitare.

Principiul lucrării

Saccharomyces cerevisiae își adaptează metabolismul la disponibilitatea oxigenului. În prezența oxigenului, glucoza poate fi oxidată complet până la CO_2 și H_2O prin respirație, cu randament energetic ridicat (aproximativ 30–36 ATP / glucoză). În absența oxigenului, drojdia recurge la fermentația alcoolică, cu randament de numai 2 ATP / glucoză.

$$\text{Aerob: } C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

$$\text{Anaerob: } C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

PRECIZARE — efectul Crabtree

S. cerevisiae este o drojdie „Crabtree-pozitivă": la concentrații mari de glucoză (peste aproximativ 1 g/L) fermentează chiar și în prezența oxigenului. Ambele căi produc CO_2, astfel încât degajarea de gaz nu diferențiază singură respirația de fermentație.

La glucoză 10 % diferența dintre eprubete se datorează în principal accesului limitat al oxigenului în eprubeta închisă. Pentru a evidenția efectul Pasteur (inhibarea fermentației de către oxigen), se utilizează varianta cu glucoză 0,5–1 % și aerare prin agitare. Produsul care diferențiază căile metabolice este etanolul.

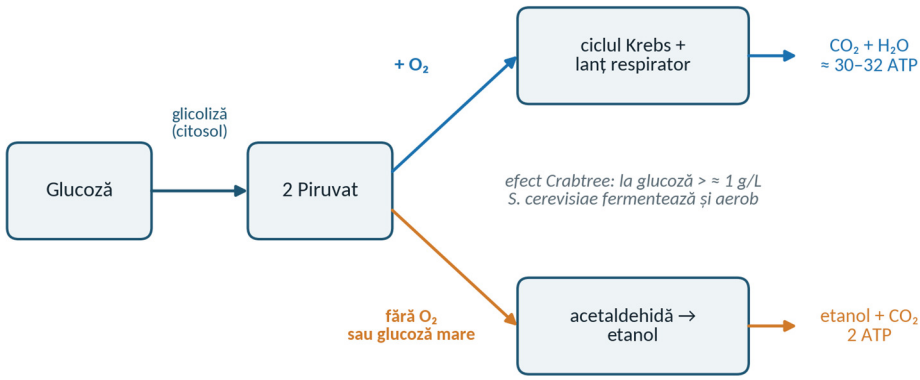


Figura 8.2. Destinul piruvatului în funcție de oxigen și de concentrația glucozei.

Materiale și reactivi

- drojdie uscată activă (≈ 1 g / probă);
- soluție de glucoză 10 % (m/V) și, pentru varianta comparativă, 1 % (m/V), în apă purificată caldă (≈ 35 °C);
- opțional: tampon pH 5,0–5,5;
- lapte de var;
- 2–4 eprubete de 20–25 mL cu dopuri (unul perforat sau tifon, unul etanș cu tub de evacuare);
- cilindru gradat, pipete, stativ, pahar cu apă la 35–37 °C, termometru, cronometru, balon pentru captarea gazului.

PROTECȚIA MUNCII

Nu se închid ermetic recipientele rigide fără evacuarea gazului — risc de suprapresiune. Se lucrează cu halat, mănuși și ochelari.

Mod de lucru

1. Se hidratează 1 g drojdie în 10 mL apă la 35 °C, 5 minute, și se omogenizează.
2. În fiecare eprubetă se introduc 15 mL soluție de glucoză 10 % și 5 mL suspensie de drojdie.
3. Eprubeta A (aerobă): se acoperă cu dop perforat sau tifon; se agită ușor la fiecare 5 minute.
4. Eprubeta B (anaerobă): se închide cu dop etanș prevăzut cu tub care duce gazul într-un balon sau într-un vas cu lapte de var.
5. Varianta comparativă (C și D): aceleași condiții, cu glucoză 1 %.
6. Se incubează la 35–37 °C, 30–40 de minute. Se notează periodic: formarea bulelor, înălțimea spumei, turbiditatea, mirosul de etanol.
7. La final se confirmă CO_2 prin tulburarea laptelui de var.

EXEMPLU DE CALCUL — bilanț energetic

1,00 g glucoză = 1,00 / 180,16 = 5,55 mmol

fermentație: 5,55 × 2 = 11,1 mmol ATP; respirație: 5,55 × 30 = 167 mmol ATP

→ Pentru aceeași cantitate de energie, fermentația consumă de aproximativ 15 ori mai multă glucoză — de aceea viteza de degajare a CO_2 este mare în fermentație.

EXEMPLU DE CALCUL — transferul de oxigen

Bioreactor cu kLa = 100 h^{-1}; C* = 7,0 mg/L = 0,219 mmol/L; oxigenul dizolvat se menține la 40 % din saturație (C = 0,088 mmol/L).

$$OTR = 100 \times (0{,}219 - 0{,}088) = 13{,}1 \text{ mmol } O_2 / (L \cdot h)$$

O cultură cu consum specific q O_2 = 3 mmol/(g · h) poate fi susținută până la o concentrație de biomasă:

X max = 13,1 / 3 = 4,4 g/L; pentru 20 g/L este necesar kLa ≈ 460 h^{-1} (turație sau aerare mai mari, aer îmbogățit cu O_2)

Rezultate

Eprubeta	Glucoză	Oxigen	CO_2 degajat (–/+/++/+++)	Spumă (mm)	Miros de etanol	Concluzie
A	10 %	da				
B	10 %	nu				
C	1 %	da				
D	1 %	nu				

Interpretare

- În eprubeta anaerobă apar degajare abundentă de CO_2, spumă și miros alcoolic — fermentație alcoolică.
- La glucoză 10 %, și eprubeta aerobă produce CO_2 și etanol (efect Crabtree); diferența față de eprubeta B este una de intensitate.
- La glucoză 1 %, în condiții aerobe fermentația este mult redusă, iar mirosul de etanol lipsește sau este slab (efect Pasteur).

Aplicații în industria farmaceutică

În bioreactoarele industriale, oxigenul dizolvat este controlat în cascadă: când pO_2 scade sub valoarea de consemn, sistemul crește întâi turația agitatorului, apoi debitul de aer și, la final, îmbogățește aerul cu oxigen. Pentru drojdii și pentru E. coli, alimentarea cu glucoză în regim fed-batch este reglată astfel încât să se evite metabolismul de „revărsare” (etanol la drojdii, acetat la E. coli).

Un indicator util pentru conducerea procesului este **coeficientul respirator** RQ, raportul dintre viteza de formare a CO_2 (CER) și viteza de consum a O_2 (OUR), ambele măsurate prin analiza gazelor evacuate:

$RQ = CER / OUR$ RQ ≈ 1,0 — respirația glucozei; RQ > 1,1 — fermentație (formare de etanol)

Criteriu de mărire a scării	Ce se menține constant	Limitare
kLa constant	capacitatea de transfer al oxigenului	cel mai folosit pentru culturi aerobe
Putere pe volum (P/V)	energia de amestecare	crește forfecarea la scară mare
Viteza periferică a agitatorului	forfecarea maximă	amestecare mai slabă la scară mare
Timp de amestecare	omogenitatea	de obicei imposibil de păstrat constant

Surse frecvente de erori

- dopul „etanş” permite pătrunderea aerului;
- glucoza 10 % maschează diferenţele (efect Crabtree);
- eprubetele nu sunt la aceeaşi temperatură;
- aprecierea subiectivă a mirosului şi a spumei;
- volume de suspensie de drojdie inegale.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — coeficientul respirator

Analiza gazelor evacuate: CER = 18 mmol/(L · h); OUR = 12 mmol/(L · h).

$$RQ = 18 / 12 = 1,5$$

→ Cultura produce etanol (metabolism de revărsare); se reduce viteza de alimentare cu glucoză până când RQ revine la ≈ 1.

EXEMPLUL 2 — kLa necesar

Cultura consumă OUR = 30 mmol O_2/(L · h); C* = 0,22 mmol/L; oxigenul dizolvat trebuie menţinut la 30 % din saturaţie (0,066 mmol/L).

$$kLa\ necesar = OUR / (C^* - C) = 30 / (0,22 - 0,066) = 30 / 0,154 = 195\ h^{-1}$$

EXEMPLUL 3 — glucoză necesară pentru aceeaşi energie

Pentru 100 mmol ATP sunt necesare: prin fermentaţie 100 / 2 = 50 mmol glucoză; prin respiraţie 100 / 30 = 3,3 mmol glucoză.

Aerarea cu oxigen pur în loc de aer: C* creşte proporţional cu presiunea parţială a O_2 — de la 7 mg/L la 7 / 0,21 ≈ 33 mg/L.

Întrebări

1. Ce rol are oxigenul în metabolismul energetic al drojdiei?
2. De ce drojdia fermentează glucoza chiar şi în prezenţa oxigenului, la concentraţii mari de substrat?
3. De ce, în producţia de biomasă sau de proteine recombinante în drojdii, glucoza se alimentează limitat (fed-batch)?
4. Ce este coeficientul kLa şi cum poate fi crescut într-un bioreactor?
5. Care este randamentul energetic al respiraţiei comparativ cu fermentaţia?
6.

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. CER = 10 mmol/(L · h); OUR = 10 mmol/(L · h). Ce metabolism predomină?
2. kLa = 150 h^{-1}; C* = 0,22 mmol/L; C = 0,088 mmol/L. Calculați OTR.
3. Ce concentrație maximă de biomasă poate fi susținută de OTR din problema 2, dacă q O_2 = 2,5 mmol/(g · h)?
4. Câți mmol ATP se obțin din 10 mmol glucoză prin respirație (30 ATP/glucoză) și prin fermentație?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **La drojdii, RQ > 1 indică:**
   a) respirație completă
   b) fermentație cu formare de etanol
   c) lipsa glucozei
   d) contaminare bacteriană
2. **Efectul Crabtree reprezintă:**
   a) inhibarea fermentației de către oxigen
   b) fermentația în prezența oxigenului la concentrații mari de glucoză
   c) moartea celulelor în absența oxigenului
   d) creșterea randamentului ATP
3. **kLa crește prin:**
   a) scăderea turației
   b) creșterea turației și a debitului de aer
   c) creșterea vâscozității mediului
   d) scăderea temperaturii
4. **Regimul fed-batch se folosește pentru:**
   a) a evita metabolismul de revărsare și represia catabolică
   b) a scurta sterilizarea
   c) a elimina aerarea
   d) a crește volumul inițial

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 9

Enzime proteolitice: hidroliza cazeinei cu papainăși tripsină

Manual: *Capitolul 7 — Introducere în biotehnologia farmaceutică*

Obiective

- evidențierea activității proteolitice a papainei și tripsinei;
- evaluarea rolului martorilor (enzimă inactivată termic, absența enzimei);
- înțelegerea dependenței activității enzimatice de pH și temperatură.

Noțiuni teoretice

Enzimele sunt biocatalizatori selectivi, activi în condiții blânde de temperatură și pH. În industria farmaceutică ele sunt utilizate ca substanțe active (enzime digestive, trombolitice, enzime de substituție), ca instrumente de proces (penicilinacilaza, care transformă penicilina G în acid 6-aminopenicilanic) sau ca reactivi analitici. Majoritatea enzimelor terapeutice moderne sunt produse prin tehnologia ADN recombinant.

Viteza unei reacții enzimatice depinde de concentrația substratului conform ecuației Michaelis–Menten. Vmax este proporțională cu cantitatea de enzimă activă, iar Km este concentrația de substrat la care viteza este jumătate din Vmax. Temperatura crește viteza până la temperatura optimă, după care denaturarea domină; pH-ul modifică starea de ionizare a situsului activ (figura 9.2).

$$v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

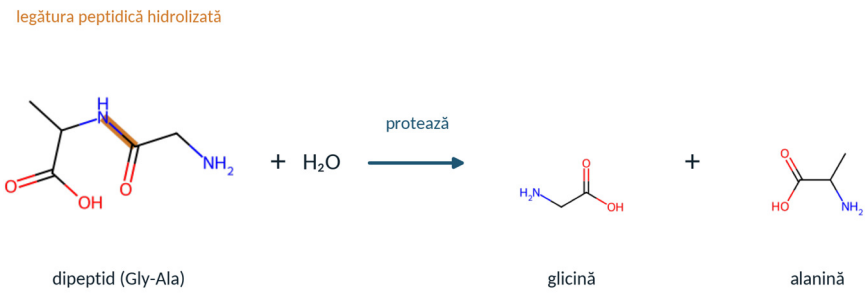


Figura 9.1. Hidroliza enzimatică a legăturii peptidice (exemplu: dipeptidul glicil-alanină).

Principiul lucrării

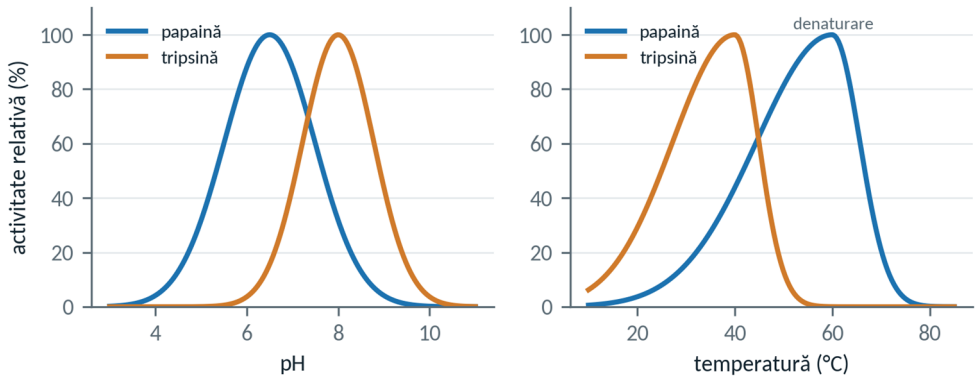
Proteazele catalizează hidroliza legăturilor peptidice, cu formare de peptide și aminoacizi. Cazeina din lapte se găsește sub formă de micele coloidale care dau aspectul opac. Hidroliza enzimatică fragmentează și solubilizează cazeina, iar laptele diluat se clarifică progresiv.

$$\text{Proteină} + H_2O \rightarrow \text{peptide} + \text{aminoacizi} \quad \text{(hidroliză catalizată enzimatic)}$$

Enzimă	Sursă	pH optim	Temperatură optimă
Papaină	latexul de Carica papaya	6–7	55–60 °C
Tripsină	pancreas	7,5–8,5	37 °C

PRECIZARE

Papaina are și activitate coagulantă asupra laptelui: în primele minute pot apărea flocoane fine, care apoi se dizolvă pe măsură ce hidroliza avansează. Clarificarea se urmărește mai ușor pe lapte degresat diluat.



profiluri orientative

Figura 9.2. Dependența activității papainei și tripsinei de pH și de temperatură.

Materiale și reactivi

- lapte degresat diluat 1 : 4 cu apă (sau lapte praf degresat 2 %);
- soluție de papaină 1 % sau soluție de tripsină 1 %;
- tampon fosfat pH 6,5 (pentru papaină) și tampon Tris-HCl pH 8 (pentru tripsină);
- apă purificată; opțional NaOH 0,1 M și HCl 0,1 M pentru ajustarea pH-ului;
- eprubete, stativ, pipete, baie de apă termostatată, termometru, cronometru, pH-metru sau benzi de pH;
- opțional: spectrofotometru (600 nm).

Protecția muncii

- halat, mănuși, ochelari;
- pulberile enzimatice sunt potențial alergizante — se evită inhalarea și contactul prelungit cu pielea.

Mod de lucru

1. Se etichetează trei eprubete: E1 — lapte + enzimă activă; E2 — lapte + enzimă inactivată termic (5 minute la 100 °C); E3 — lapte + apă.
2. În fiecare eprubetă se introduc 5 mL lapte diluat, adus la pH-ul optim al enzimei alese.
3. Se adaugă: în E1, 1 mL soluție enzimatică; în E2, 1 mL soluție enzimatică fiartă și răcită; în E3, 1 mL apă purificată.
4. Eprubetele se introduc în baia de apă la temperatura optimă (55–60 °C pentru papaină; 37 °C pentru tripsină), 20–30 de minute, cu agitare ușoară la fiecare 5 minute.
5. Se notează timpul la care apare clarificarea vizibilă.
6. Opțional: se citește absorbanța la 600 nm la 0, 10, 20 și 30 de minute; scăderea absorbanței indică hidroliza.

Calcule

$$\text{Grad de clarificare (\%)} = (A_0 - A_{30}) \times 100 / A_0 \qquad v_{inițială} = \Delta A / \Delta t$$

EXEMPLU DE CALCUL

E1 (tripsină, 37 °C): A_{600} = 0,850 (0 min); 0,540 (10 min); 0,395 (20 min); 0,310 (30 min). Martorii rămân la 0,84–0,86.

Grad de clarificare la 30 min = (0,850 − 0,310) × 100 / 0,850 = 63,5 %

Viteza inițială (0–10 min) = (0,850 − 0,540) / 10 = 0,031 unități de absorbanță / min

Viteza între 20 și 30 min = (0,395 − 0,310) / 10 = 0,0085 / min — de 3,6 ori mai mică (substratul se epuizează)

Rezultate

Eprubeta	Conținut	Aspect la 10 min	Aspect la 30 min	Timp de clarificare (min)	A_{600} final
E1	lapte + enzimă activă				
E2	lapte + enzimă inactivată				
E3	lapte + apă				

Interpretare

- Proba E1 se clarifică progresiv — cazeina este hidrolizată.
- Martorii E2 și E3 rămân opaci: enzima denaturată termic este inactivă, iar în absența enzimei nu are loc hidroliza.

Aplicații în industria farmaceutică

Enzimă	Utilizare	Tip de aplicație
Pancreatină (lipază, amilază, proteaze)	insuficiența pancreatică exocrină	substanță activă
Alteplază (activator tisular al plasminogenului)	accident vascular ischemic, infarct miocardic	substanță activă recombinantă
L-asparaginază	leucemie acută limfoblastică	substanță activă
Penicilinacilază	acid 6-aminopenicilanic din penicilina G	biocatalizator industrial
Lipaze	rezoluția enantiomerilor, esterificări	biocatalizator industrial
Transaminaze modificate	sinteza sitagliptinului	biocatalizator industrial
Tripsină	detașarea celulelor aderente, maturarea insulinei	reactiv de proces

Enzimele industriale sunt adesea **imobilizate** pe suporturi solide: pot fi recuperate și reutilizate în sute de cicluri, iar produsul nu este contaminat cu proteina enzimatică. Activitatea se exprimă în unități (1 U = 1 µmol substrat transformat pe minut), iar puritatea în activitate specifică (U/mg proteină).

Dependența vitezei de temperatură, sub temperatura de denaturare, se descrie prin coeficientul Q_{10} — factorul cu care crește viteza la o creștere a temperaturii cu 10 °C:

$$Q_{10} = (v_2 / v_1)^{(10 / (T_2 - T_1))}$$

Surse frecvente de erori

- pH-ul nu este ajustat la optimul enzimei;
- temperatura băii nu este controlată;
- enzimă depozitată necorespunzător, cu activitate redusă;
- lapte prea concentrat — clarificarea nu se observă;
- aprecierea subiectivă a momentului clarificării.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — ecuația Michaelis–Menten

Vmax = 120 µmol/min; Km = 2 mM.

la [S] = 0,5 mM: v = 120 × 0,5 / (2 + 0,5) = 24 µmol/min (20 % din Vmax)

la [S] = 10 mM: v = 120 × 10 / (2 + 10) = 100 µmol/min (83 % din Vmax)

EXEMPLUL 2 — determinarea Km și Vmax din două măsurători

La [S] = 1 mM, v = 40; la [S] = 4 mM, v = 80 (µmol/min).

$40 = V \cdot 1 / (Km + 1)$ și $80 = V \cdot 4 / (Km + 4) \rightarrow 40 (Km + 1) = 20 (Km + 4) \rightarrow Km = 2$ mM

$V = 40 \times (2 + 1) = 120$ µmol/min

EXEMPLUL 3 — Q_{10} și activitatea specifică

Viteza clarificării este 0,020 /min la 27 °C și 0,041 /min la 37 °C.

$$Q_{10} = 0{,}041 / 0{,}020 = 2{,}05$$

1 mL soluție de enzimă 1 % (10 mg) hidrolizează 150 µmol substrat/min: activitate specifică = 150 / 10 = 15 U/mg.

Întrebări

1. Ce tip de legătură hidrolizează proteazele?
2. De ce enzima fiartă nu mai este activă?
3. Cum influențează pH-ul și temperatura activitatea enzimatică?
4. Dați exemple de enzime utilizate în industria farmaceutică, ca substanțe active și ca instrumente de proces.
5. Ce avantaje are biocataliza față de o secvență de reacții chimice clasice?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. La ce concentrație de substrat v = 0,9 · Vmax (Km = 2 mM)?
2. 5 mg enzimă transformă 60 µmol substrat în 4 minute. Calculați activitatea specifică.
3. $Q_{10} = 2$; viteza la 25 °C este 0,010 /min. Care este viteza la 35 °C?
4. A_{600} scade de la 0,900 la 0,360. Calculați gradul de clarificare.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Km reprezintă:**
   a) viteza maximă
   b) concentrația de substrat la care v = Vmax/2
   c) concentrația de enzimă
   d) constanta de inhibiție
2. **Papaina este:**
   a) o protează serinică pancreatică
   b) o protează cisteinică din Carica papaya
   c) o lipază
   d) o amilază

3. **Tripsina scindează legăturile peptidice după:**
   a) lizină și arginină
   b) fenilalanină și tirozină
   c) glicină
   d) prolină
4. **1 unitate enzimatică (U) corespunde transformării a:**
   a) 1 mol/min
   b) 1 mmol/s
   c) 1 μmol/min
   d) 1 mg/min

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 10

Biosinteza antibioticelor: activitatea antibacteriană a culturilor de Penicillium

Manual: *Capitolul 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice (9.10. Fermentația penicilinei)*

Obiective

- cultivarea mucegaiului Penicillium pe mediu solid;
- demonstrarea producerii unui metabolit secundar cu activitate antibacteriană;
- măsurarea și interpretarea zonelor de inhibiție.

Noțiuni teoretice

Antibioticele sunt metaboliți secundari, produși de microorganisme mai ales în faza staționară a creșterii. Penicilina, descoperită de Alexander Fleming în 1928, este produsă industrial de Penicillium chrysogenum (reclasificat taxonomic ca P. rubens). Fermentația industrială se conduce la 25 °C și pH 6,5, cu oxigen dizolvat peste 40 % din saturație, cu glucoză alimentată limitat (glucoza în exces reprimă biosinteza) și cu alimentarea continuă a precursorului lanțului lateral, acidul fenilacetic. Cea mai mare parte a penicilinei G este transformată enzimatic în acid 6-aminopenicilanic, punctul de plecare al penicilinelor semisintetice.

Principiul lucrării

Penicillium cultivat pe mediu solid eliberează penicilină în agar. Un fragment de cultură sau un extract apos, plasat pe o placă însămânțată cu o bacterie sensibilă, produce prin difuzie o zonă clară, fără creștere bacteriană, în jurul probei. Penicilina inhibă sinteza peretelui celular, fiind activă mai ales asupra bacteriilor Gram-pozitive.

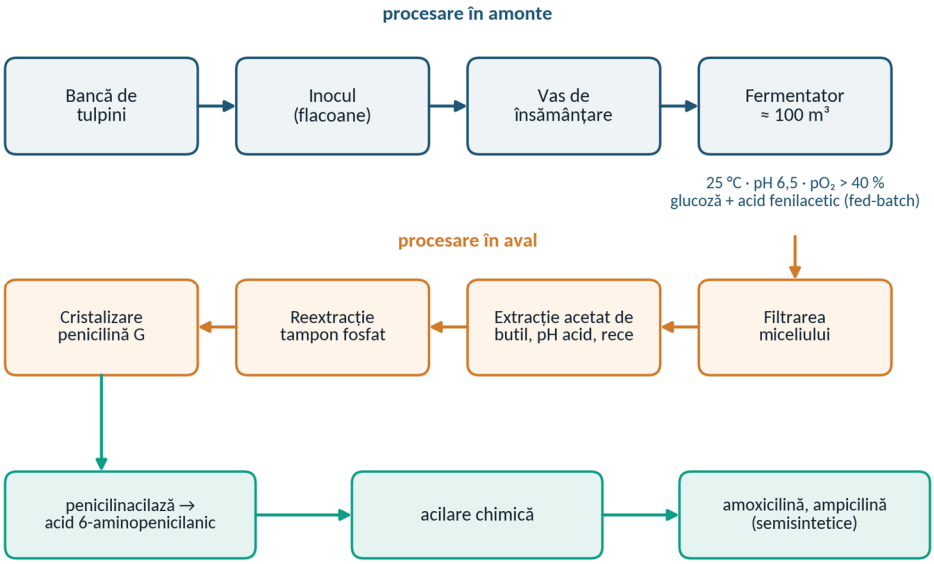


Figura 10.1. Fluxul industrial al penicilinei: procesare în amonte, procesare în aval și obținerea penicilinelor semisintetice.

Activitatea unui antibiotic se poate determina cantitativ prin **dozarea microbiologică** (Ph. Eur. 2.7.2): diametrul zonei de inhibiție variază liniar cu logaritmul concentrației. Cu soluții standard de concentrație cunoscută se trasează o curbă de etalonare, din care se citește concentrația probei.

$$Ø\ \text{zonă} = a + b \cdot \lg c$$

Materiale și reactivi

- cultură de Penicillium chrysogenum (P. notatum), pe placă, cu vârsta de 5–7 zile;
- bacterii test, din grupa 1 de risc biologic: Bacillus subtilis (Gram-pozitiv) și, pentru comparație, Escherichia coli K-12 (Gram-negativ);
- mediu Czapek-Dox modificat (cu glucoză), pentru Penicillium: glucoză 30 g, $NaNO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, KCl 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g, agar 15 g, apă distilată până la 1 L; pH 6,5; sterilizare 20 minute la 121 °C;
- agar nutritiv sau agar Mueller-Hinton, pentru bacteriile test;
- discuri sterile de hârtie de filtru (6 mm), discuri standard de penicilină (martor pozitiv), apă sterilă;
- plăci Petri sterile, ansă, tampoane sterile, pensă, tub de sticlă steril sau găuritor de dop (6–8 mm) pentru decuparea cilindrilor de agar;
- etanol 70 %, bec Bunsen, incubatoare (25–28 °C și 30–37 °C), riglă sau șubler.

PROTECȚIA MUNCII

Se lucrează aseptic, lângă flacăra becului Bunsen. Sporii de Penicillium sunt alergizanți — plăcile se deschid cât mai puțin și fără a produce aerosoli. După incubare, plăcile se examinează închise. Toate materialele biologice se autoclavează înainte de eliminare.

Mod de lucru

1. Cultivarea mucegaiului (cu 5–7 zile înainte)

1. Se inoculează Penicillium în centrul unei plăci cu mediu Czapek-Dox.
2. Se incubează la 25–28 °C, 5–7 zile, până la formarea unei colonii catifelate, verde-albăstrui, cu margine albă.
3. Se confirmă sporularea și aspectul tipic.

2. Însămânțarea bacteriilor test

1. Pe plăci cu agar nutritiv se întinde uniform, cu tamponul steril, o suspensie de B. subtilis; separat, o suspensie de E. coli.
2. Plăcile se lasă 10 minute să se usuce suprafața.

3. Metoda cilindrilor de agar

1. Cu tubul steril se decupează cilindri de agar cu miceliu din zona de creștere a coloniei de Penicillium.
2. Cilindrii se așază, cu miceliul în sus, pe plăcile însămânțate (2 cilindri pe placă).
3. Pe aceeași placă se așază un cilindru din mediu Czapek-Dox neinoculat (martor negativ) și un disc standard de penicilină (martor pozitiv).

4. Metoda discurilor cu extract (variantă)

1. Fragmente de miceliu cu agar (0,5–1 cm^2) se agită 10–15 minute în 20–30 mL apă sterilă și se filtrează prin tifon steril — extract brut.
2. Discurile sterile se impregnează cu extract (D1) și cu apă sterilă (D2) și se așază pe plăcile însămânțate, alături de discul standard de penicilină (D3).

5. Incubarea și citirea

1. Plăcile se incubează la 30–37 °C, 18–24 de ore.
2. Se măsoară diametrul zonelor de inhibiție (mm), inclusiv diametrul cilindrului sau al discului.

6. Dozarea microbiologică (opțional)

1. Se prepară soluții standard de penicilină G de 0,1; 0,3; 1; 3 și 10 UI/mL în tampon fosfat pH 6.
2. Pe plăci însămânțate cu B. subtilis se așază discuri impregnate cu câte 20 µL din fiecare standard și din extractul de Penicillium.
3. După incubare se măsoară zonele și se trasează Ø = f(lg c).

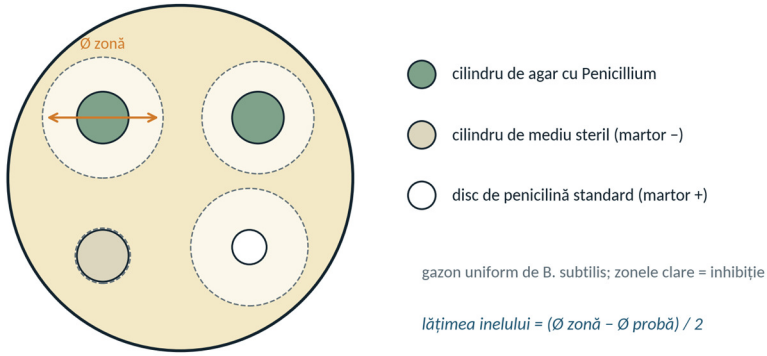


Figura 10.2. Aspectul plăcii după incubare și modul de măsurare a zonelor de inhibiție.

EXEMPLU DE CALCUL

Cilindrul cu Penicillium (Ø 6 mm), trei plăci: zone de 18, 20 și 19 mm → $\bar{x}$ = 19,0 mm; s = 1,0 mm.

$$\text{Lățimea inelului de inhibiție} = (19{,}0 - 6) / 2 = 6{,}5 \text{ mm}$$

Curba de etalonare obținută: Ø = 16 + 6 · lg c (c în UI/mL). Extractul brut dă o zonă de 13 mm:

$$\lg c = (13 - 16) / 6 = -0{,}50 \quad \rightarrow \quad c = 10^{-0.5} = 0{,}32 \text{ UI/mL}$$

→ 1 UI de penicilină G sodică corespunde la 0,6 µg; extractul conține ≈ 0,19 µg/mL — de ordinul valorilor produse de tulpinile sălbatice, foarte departe de titrurile industriale.

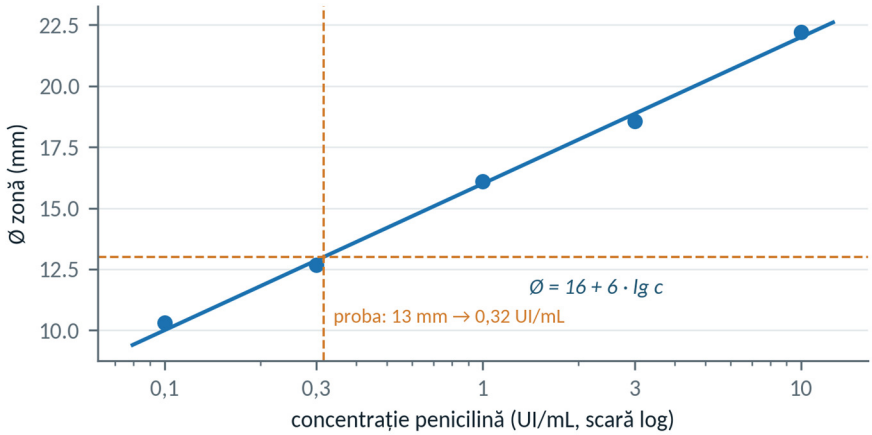


Figura 10.3. Curba de etalonare pentru dozarea microbiologică (date ilustrative).

Rezultate

Probă	B. subtilis — zonă (mm)	E. coli — zonă (mm)	Interpretare
Cilindru cu Penicillium			
Cilindru mediu steril (martor negativ)			
D1 — extract brut			
D2 — apă sterilă			
D3 — penicilină standard			

Valori orientative: zone de 10–25 mm pentru cilindrul cu Penicillium pe B. subtilis; zone mai mici pentru extractul brut, care este diluat; zone absente sau mici pe E. coli.

Factori care influențează biosinteza antibioticelor

Factor	Efect asupra producției
Tulpina	Tulpinile industriale ameliorate produc de mii de ori mai mult decât izolatul lui Fleming.
Sursa de carbon	Glucoza în exces reprimă biosinteza; se alimentează limitat (fed-batch) sau se folosesc glucide metabolizate lent (lactoză).
Precursorul	Acidul fenilacetic furnizează lanțul lateral al penicilinei G; este toxic și se alimentează continuu, la concentrații mici.
pH	Optimum ≈ 6,5, menținut automat.
Temperatura	≈ 25 °C pentru producție.
Aerarea și agitarea	Proces strict aerob; oxigenul dizolvat se menține peste 40 % din saturație.
Faza de creștere	Penicilina se formează în faza de producție (staționară), după încetinirea creșterii.

Aplicații în industria farmaceutică

Antibiotic	Organism producător	Clasă
Penicilina G	Penicillium chrysogenum (P. rubens)	β-lactamă
Cefalosporina C	Acremonium chrysogenum	β-lactamă (precursor al cefalosporinelor)
Streptomicina	Streptomyces griseus	aminoglicozid
Eritromicina	Saccharopolyspora erythraea	macrolidă
Tetraciclina	Streptomyces aureofaciens	tetraciclină
Vancomicina	Amycolatopsis orientalis	glicopeptid
Nistatina	Streptomyces noursei	polienă antifungică

Pentru antibioticele obținute prin fermentație care sunt amestecuri de componente înrudite (neomicină, gentamicină, nistatină, bacitracină), farmacopeea prescrie **dozarea microbiologică** (Ph. Eur. 2.7.2): potența se exprimă în unități internaționale (UI), prin comparație cu un standard, deoarece activitatea biologică nu poate fi dedusă simplu din masă.

Ameliorarea tulpinilor, prin mutageneză clasică și, mai recent, prin inginerie metabolică, a crescut producția de penicilină de la câteva miligrame pe litru, la tulpina lui Fleming, la zeci de grame pe litru în procesele industriale actuale.

Surse frecvente de erori

- gazon bacterian neuniform sau prea dens;
- grosimea agarului diferă între plăci — zonele nu sunt comparabile;
- discuri sau cilindri contaminați;
- timpul dintre așezarea probelor și incubare diferă (prediffuzie);
- măsurarea razei în locul diametrului sau includerea incorectă a discului;
- plăci deschise după incubare (risc biologic).

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — curbă de etalonare din două standarde

Standard 0,5 UI/mL → zonă 12 mm; standard 8 UI/mL → zonă 20 mm; proba → 16 mm.

$$\text{panta } b = (20 - 12) / (\lg 8 - \lg 0{,}5) = 8 / 1{,}204 = 6{,}64 \text{ mm pe decadă}$$

$$\lg c = \lg 0{,}5 + (16 - 12) / 6{,}64 = -0{,}301 + 0{,}602 = 0{,}301 \;\rightarrow\; c = 2{,}0 \text{ UI/mL}$$

EXEMPLUL 2 — conversia UI în masă

Penicilina G sodică are aproximativ 1 670 UI/mg. Un flacon de 3 000 000 UI conține:

$$m = 3\,000\,000 / 1\,670 = 1\,796 \text{ mg} \approx 1{,}80 \text{ g}$$

EXEMPLUL 3 — producția unui lot industrial

Fermentator de 100 m^3, titru final 40 g/L, randament al procesării în aval 85 %.

$$m = 100\,000 \text{ L} \times 40 \text{ g/L} \times 0{,}85 = 3\,400\,000 \text{ g} = 3{,}4 \text{ t penicilină G pe lot}$$

Întrebări

1. De ce antibioticele sunt considerate metaboliți secundari?
2. De ce penicilina G este mai puțin activă asupra bacteriilor Gram-negative?
3. De ce glucoza în exces scade producția de penicilină?
4. Care este rolul acidului fenilacetic în fermentație?
5. Cum se obțin penicilinele semisintetice din penicilina G?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Zona de inhibiție are 24 mm, iar discul 6 mm. Calculați lățimea inelului.
2. Un extract diluat 1 : 10 dă o concentrație de 0,32 UI/mL. Care este concentrația extractului nediluat?
3. Câte grame de penicilină G sodică corespund la 1 200 000 UI?
4. Fermentator de 150 m^3, titru 35 g/L, randament de recuperare 88 %. Calculați producția pe lot.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Penicilina inhibă:**
   a) sinteza proteinelor
   b) sinteza peretelui celular bacterian
   c) replicarea ADN
   d) funcția membranei citoplasmatice
2. **Precursorul lanțului lateral al penicilinei G este:**
   a) acidul fenilacetic
   b) acidul acetic
   c) fenolul
   d) glucoza
3. **În dozarea microbiologică, diametrul zonei variază liniar cu:**
   a) concentrația
   b) logaritmul concentrației
   c) pătratul concentrației
   d) inversul concentrației

4. **Acidul 6-aminopenicilanic se obţine industrial prin:**
   a) sinteză totală
   b) scindare enzimatică cu penicilinacilază
   c) fermentație directă
   d) hidroliză acidă

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 11

Activitatea enzimatică a catalazei

Manual: *Capitolul 7 — Introducere în biotehnologia farmaceutică*

Obiective

- evidențierea activității catalazei în extracte vegetale și animale;
- măsurarea semicantitativă a vitezei de reacție prin volumul de O_2 eliberat;
- evaluarea efectului inactivării termice, al pH-ului și al temperaturii.

Noțiuni teoretice

Catalaza este una dintre cele mai rapide enzime cunoscute: o singură moleculă poate descompune milioane de molecule de H_2O_2 pe secundă. Activitatea se exprimă în **unități enzimatice**: 1 U este cantitatea de enzimă care transformă 1 µmol de substrat pe minut, în condiții definite. Pentru comparații se folosește activitatea specifică (U/mg proteină sau U/g țesut).

Viteza reacției se determină din porțiunea inițială, liniară, a curbei de produs format în funcție de timp (figura 11.1). Pe măsură ce substratul se consumă, viteza scade, iar curba tinde spre volumul maxim de O_2 corespunzător cantității de H_2O_2 introduse.

Principiul lucrării

Catalaza este o hemoproteină prezentă în aproape toate celulele aerobe, vegetale și animale. Ea descompune peroxidul de hidrogen, produs toxic al metabolismului, în apă și oxigen molecular. Degajarea bulelor de oxigen este indicatorul vizual al activității enzimatice. Intensitatea reacției depinde de concentrația substratului, de cantitatea de enzimă, de pH și de temperatură.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2\uparrow$$

Testul catalazei este folosit și în microbiologie pentru identificare: bacteriile lactice, de exemplu, sunt catalază-negative (lucrarea 12).

Materiale și reactivi

- peroxid de hidrogen 3 %;
- apă distilată;
- material biologic proaspăt: cartof, spanac, varză sau ficat;
- opțional: tampoane acetat pH 5, fosfat pH 7, Tris pH 8;
- eprubete de 20–25 mL, pahare Berzelius de 100 mL, cilindru gradat de 100 mL, pipete;
- mojar cu pistil, tifon sau hârtie de filtru, termometru, stativ, cronometru, baie de apă;
- opțional: cilindru gradat inversat în apă sau seringă de gaz, pentru colectarea O_2.

Protecția muncii

- mănuși și ochelari;

- H_2O_2 este iritant și oxidant — se evită contactul cu pielea și ochii;
- nu se folosesc extracte vechi.

Mod de lucru

1. Prepararea extractului

1. Se mărunțesc 5–10 g material biologic.
2. Se adaugă 10–15 mL apă distilată și se triturează în mojar până la o pastă omogenă.
3. Se filtrează prin tifon — extract enzimatic brut.

2. Reacția

1. Se etichetează trei eprubete: E1 — extract + H_2O_2 (proba activă); E2 — apă + H_2O_2 (martor fără enzimă); E3 — extract fiert 1 minut, răcit + H_2O_2 (enzimă inactivată).
2. În fiecare eprubetă se introduc 2 mL extract (sau apă) și apoi 2 mL H_2O_2 3 %.
3. Se amestecă ușor și se observă reacția imediată; se măsoară înălțimea spumei după 1 minut.

3. Măsurarea semicantitativă (opțional)

1. Gazul eliberat se colectează într-un cilindru gradat inversat, umplut cu apă.
2. Se citește volumul de O_2 eliberat în primul minut.
3. Se notează timpul până la oprirea reacției.
4. Se poate repeta la pH 5, 7 și 8 (extract diluat în tampon) sau la 4, 25, 37 și 60 °C.

Calcule

Activitate relativă (%) = V O_2 probă × 100 / V O_2 proba E1

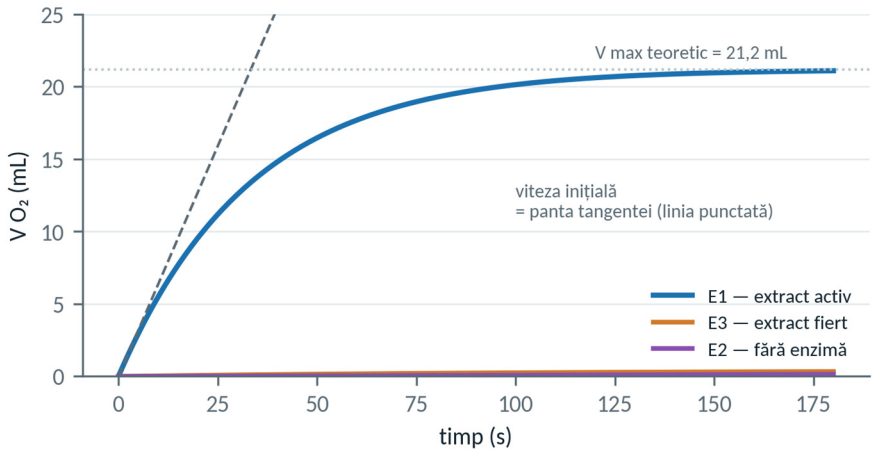


Figura 11.1. Cinetica eliberării oxigenului: proba activă și martorii (date ilustrative).

EXEMPLU DE CALCUL

H_2O_2 introdus: 2 mL soluție 3 % (m/V) = 60 mg / 34,01 mg/mmol = 1,76 mmol → O_2 maxim = 0,88 mmol × 24 000 mL/mol = 21,2 mL

În primul minut s-au colectat 18 mL O_2.

n O_2 = 18 / 24 000 = 0,75 mmol → n H_2O_2 descompus = 2 × 0,75 = 1,50 mmol (85 % din substrat)

Extractul: 7,5 g cartof în 15 mL apă → 0,5 g țesut/mL; în probă, 2 mL = 1,0 g țesut.

Activitate ≈ 1 500 µmol H_2O_2 / min / g țesut = 1 500 U/g (valoare minimă, substratul s-a epuizat în primul minut)

→ Pentru o determinare corectă, extractul se diluează până când în primul minut se consumă cel mult 20–30 % din substrat.

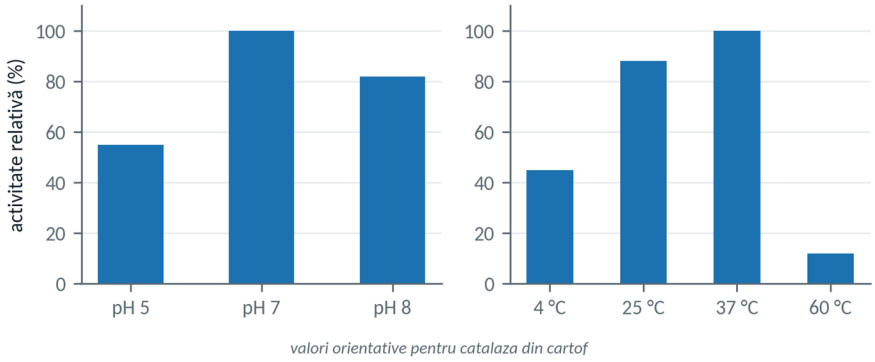


Figura 11.2. Influența pH-ului și a temperaturii asupra activității catalazei.

Rezultate

Eprubeta	Compoziție	Observații	Spumă (mm)	V O_2 (mL/min)	Activitate relativă (%)
E1	extract + H_2O_2				100
E2	apă + H_2O_2				
E3	extract fiert + H_2O_2				

Condiție	pH 5	pH 7	pH 8	4 °C	25 °C	37 °C	60 °C
V O_2 (mL/min)							

Interpretare

- Activitatea catalazică apare numai în proba cu enzimă activă.
- Enzima este inactivată termic; activitatea este maximă la pH aproape neutru și la temperaturi moderate.
- Degajarea lentă de bule în martori provine din descompunerea spontană a H_2O_2.

Aplicații în industria farmaceutică

Aplicație	Rolul catalazei sau al peroxidului
Decontaminarea izolatoarelor cu H_2O_2 vaporizat (VHP)	microorganismele catalază-pozitive și sporii sunt mai rezistenți; ciclurile se validează cu indicatori biologici (spori de Geobacillus stearothermophilus)
Industria alimentară	îndepărtarea H_2O_2 rezidual după sterilizarea la rece a laptelui sau după albire
Sisteme glucozoxidază–catalază	îndepărtarea oxigenului din produse sensibile la oxidare
Diagnostic de laborator	peroxidaza de hrean (HRP) — enzimă de detecție în testele ELISA
Identificare microbiană	testul catalazei diferențiază stafilococii (pozitivi) de streptococi (negativi)

Concentrația soluțiilor de peroxid de hidrogen se exprimă uneori în „volume”: volumul de O_2 (L, în condiții normale) eliberat de 1 L soluție. Soluția de 3 % corespunde aproximativ la „10 volume”. Concentrația exactă se verifică prin titrare permanganometrică:

$$2\ MnO_4^- + 5\ H_2O_2 + 6\ H^+ \rightarrow 2\ Mn^{2+} + 5\ O_2 + 8\ H_2O$$

Surse frecvente de erori

- extract vechi sau păstrat la cald — activitate redusă;
- soluție de H_2O_2 descompusă în timp (concentrație reală mai mică);
- temperatura diferă între probe;
- pierderi de gaz la colectare;
- citirea înălțimii spumei la momente diferite.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — verificarea concentrației H_2O_2

Soluția de H_2O_2 se diluează 1 : 10. 10,00 mL din soluția diluată, acidulați, consumă 17,6 mL $KMnO_4$ 0,02 M.

$$n\ MnO_4^- = 17{,}6 \times 0{,}02 = 0{,}352\ mmol;\quad n\ H_2O_2 = 0{,}352 \times 5/2 = 0{,}880\ mmol$$

$$c\ diluat = 0{,}880 / 10{,}00 = 0{,}0880\ M;\quad c\ inițial = 0{,}880\ M \times 34{,}01 = 29{,}9\ g/L \approx 3{,}0\ \%$$

EXEMPLUL 2 — viteza inițială și activitatea

Cu 0,1 g țesut (extract diluat), în primele 20 s se colectează 6 mL O_2.

n O_2 = 6 / 24 000 = 0,25 mmol → n H_2O_2 = 0,50 mmol în 20 s → 1,5 mmol/min = 1 500 µmol/min

activitate = 1 500 U / 0,1 g = 15 000 U/g țesut

EXEMPLUL 3 — timp de înjumătățire și „volume”

Reacția urmează o cinetică de ordinul I cu k = 0,03 s^{-1}: $t_{½}$ = 0,693 / 0,03 = 23 s.

1 L H_2O_2 3 %: 30 g / 34,01 = 0,882 mol H_2O_2 → 0,441 mol O_2 × 22,4 L/mol = 9,9 L ≈ „10 volume”.

Întrebări

1. Care este rolul fiziologic al catalazei?
2. De ce extractul fiert nu mai descompune H_2O_2?
3. Cum variază activitatea enzimei cu pH-ul și temperatura? Explicați forma curbei.
4. La ce folosește testul catalazei în identificarea microorganismelor?
5. Ce aplicații industriale au enzimele oxidoreductaze?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Ce concentrație procentuală are o soluție de H_2O_2 „20 de volume”?
2. Care este volumul maxim de O_2 (25 °C) eliberat de 3 mL H_2O_2 3 %?
3. Timpul de înjumătățire al reacției este 40 s. Calculați constanta de viteză.
4. Proba E1 eliberează 20 mL O_2/min, iar o probă incubată la 60 °C, 7 mL/min. Calculați activitatea relativă.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Catalaza conține în situsul activ:**
   a) cupru
   b) hem (fier)
   c) zinc
   d) magneziu
2. **Bacteriile lactice sunt:**
   a) catalază-pozitive
   b) catalază-negative
   c) oxidază-pozitive
   d) sporulate

3. **Viteza inițială a unei reacții enzimatice se determină:**
   a) din volumul final
   b) din porțiunea liniară inițială a curbei produs–timp
   c) la echilibru
   d) după epuizarea substratului
4. **Concentrația H_2O_2 se verifică prin titrare cu:**
   a) NaOH
   b) $KMnO_4$
   c) $AgNO_3$
   d) EDTA

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 12

Bacterii lactice și probiotice: cultivare și activitate fermentativă

Manual: *Capitolul 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice*

Obiective

- izolarea bacteriilor lactice pe mediu selectiv MRS;
- determinarea acidității titrabile ca măsură a activității fermentative;
- cunoașterea criteriilor care definesc un probiotic.

Noțiuni teoretice

Bacteriile lactice se împart după produșii de fermentație în homolactice, care formează aproape exclusiv acid lactic pe calea glicolitică, și heterolactice, care formează acid lactic, etanol și CO_2 pe calea fosfocetolazei (figura 12.1). Acidifierea mediului, producerea de bacteriocine (de exemplu nizina) și competiția pentru nutrienți explică efectul lor antimicrobian.

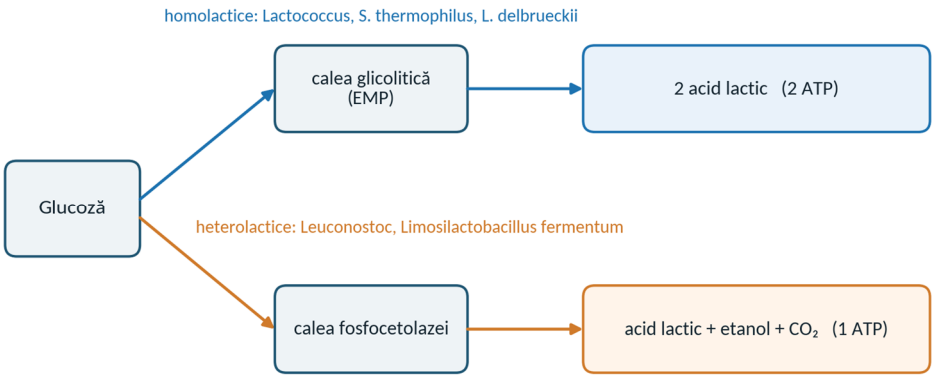


Figura 12.1. Căile fermentației lactice.

Produsele probiotice se caracterizează prin numărul de celule viabile, exprimat în unități formatoare de colonii (UFC). Numărarea se face prin diluții zecimale succesive și însămânțarea unui volum cunoscut; se iau în calcul plăcile cu 30–300 de colonii.

Principiul lucrării

Bacteriile lactice (Lactobacillus și genurile înrudite, Lactococcus, Streptococcus thermophilus) sunt bacterii Gram-pozitive, catalază-negative, care fermentează glucidele — în special lactoza — cu formare de acid lactic. Activitatea lor metabolică se demonstrează prin creșterea pe mediul selectiv MRS (de Man, Rogosa și Sharpe) și prin aciditatea titrabilă produsă în mediul de cultură.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3{-}CHOH{-}COOH \quad \text{(fermentație homolactică)}$$

Materiale și reactivi

- iaurt proaspăt, cu culturi vii (sau un produs probiotic);
- mediu MRS solid (plăci) și lichid (eprubete);
- apă distilată sterilă, soluție NaOH 0,1 M, fenolftaleină 1 %, H_2O_2 3 %;
- ansă, pipete sterile, pahare Berzelius, biuretă, pH-metru sau benzi de pH, incubator la 37 °C, bec Bunsen.

Compoziția mediului MRS (1 L)	Cantitate
Peptonă	10 g
Extract de carne	8 g
Extract de drojdie	4 g
Glucoză	20 g
Tween 80	1 mL
Fosfat dipotasic (K_2HPO_4)	2 g
Acetat de sodiu	5 g
Citrat de triamoniu	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
Agar (pentru mediul solid)	15 g
Apă distilată	până la 1000 mL; pH final 6,2 ± 0,2

Protecția muncii

- se lucrează aseptic, lângă flacăra becului Bunsen;
- halat, mănuși, ochelari;
- mediile și plăcile se autoclavează (121 °C, 20 de minute) înainte de eliminare; banca se dezinfectează cu etanol 70 %.

Mod de lucru

1. Suspensia bacteriană

1. Se omogenizează 1 g iaurt cu 9 mL apă distilată sterilă (diluție 1 : 10).

2. Cultivarea

1. Pe o placă MRS se depune o picătură din suspensie și se epuizează cu ansa.

2. Într-o eprubetă cu 10 mL MRS lichid se inoculează 1 mL suspensie; o eprubetă neinoculată servește ca martor.
3. Se incubează la 37 °C, 24–48 de ore (culturile pentru titrare se pregătesc cu 24 de ore înainte).
4. Se examinează coloniile: mici, rotunde, alb-lăptoase, cu suprafață mată.
5. Testul catalazei: o colonie se amestecă pe lamă cu o picătură de H_2O_2 3 %; absența bulelor confirmă caracterul catalază-negativ.

3. Aciditatea titrabilă

1. Se iau 10 mL din cultura lichidă de 24 de ore și 10 mL din martorul neinoculat.
2. Se adaugă 2–3 picături de fenolftaleină.
3. Se titrează cu NaOH 0,1 M până la colorație roz pal persistentă 30 de secunde.
4. Se notează volumele consumate.

4. Numărarea bacteriilor lactice (opțional)

1. Din diluția 10^{-1} se prepară diluții zecimale succesive până la 10^{-6} (1 mL în 9 mL apă sterilă, cu omogenizare și pipetă nouă la fiecare pas).
2. Din diluțiile 10^{-4}, 10^{-5} și 10^{-6} se întind câte 0,1 mL pe plăci MRS.
3. După 48–72 de ore la 37 °C se numără coloniile pe plăcile cu 30–300 de colonii.

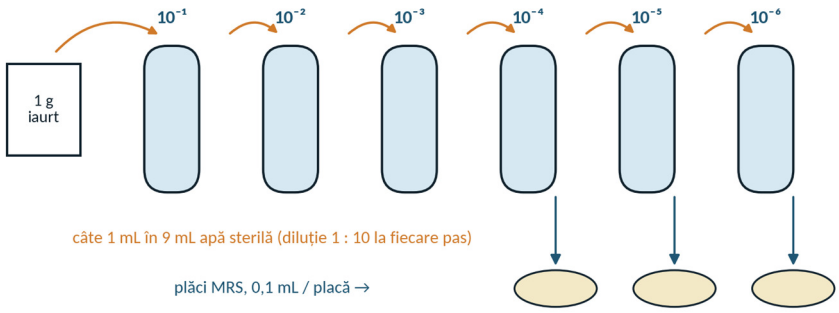


Figura 12.2. Schema diluțiilor zecimale pentru numărarea bacteriilor viabile.

UFC/mL = număr de colonii / (volum însămânțat, mL × diluție)

Calcule

Gradul Thörner (°T) reprezintă volumul (mL) de NaOH 0,1 M necesar neutralizării a 100 mL probă.

$$\text{Aciditate (°T)} = (V_{\text{probă}} - V_{\text{martor}}) \times 10$$

$$\text{Acid lactic (\%)} = (V_{\text{probă}} - V_{\text{martor}}) \times 0{,}09$$

Mediul MRS neinoculat are o aciditate proprie (tampon acetat și fosfat), care se scade din valoarea probei.

EXEMPLU DE CALCUL

Aciditate: V probă = 7,4 mL; V martor MRS = 1,2 mL NaOH 0,1 M (probe de 10 mL).

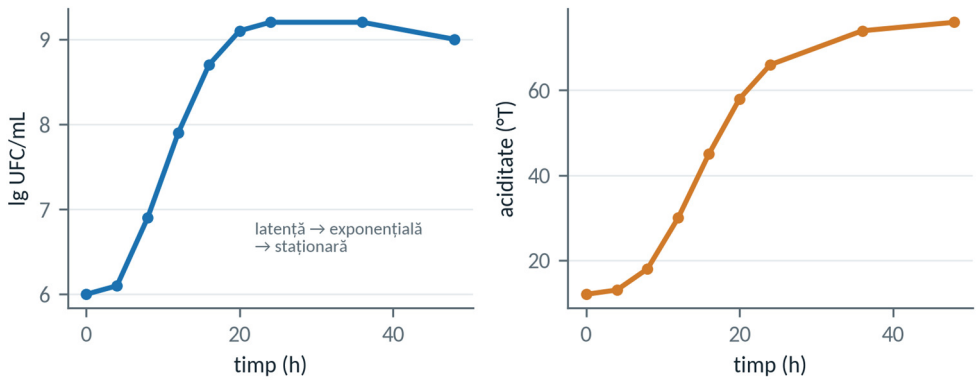
Aciditate netă = (7,4 − 1,2) × 10 = 62 °T; acid lactic = 6,2 × 0,09 = 0,56 %

Verificare: 6,2 mL × 0,1 mmol/mL = 0,62 mmol acid lactic × 90,08 = 55,9 mg în 10 mL = 0,56 %

Numărare: placa din diluția 10^{-6} (0,1 mL) are 142 de colonii.

UFC/g iaurt = 142 / (0,1 × 10^{-6}) = 1,42 × 10^{9} UFC/g

→ Valoarea depășește pragul uzual de 10^{7} UFC/g pentru produsele cu culturi vii.



date ilustrative — cultură în MRS lichid, 37 °C

Figura 12.3. Creșterea bacteriilor lactice și acumularea acidității în mediul MRS (date ilustrative).

Rezultate

Probă	Aspectul coloniilor	Catalază	V NaOH (mL)	Aciditate netă (°T)	Acid lactic (%)
Cultură 1					
Cultură 2					
Martor MRS	fără creștere	—		0	0

Ce este un probiotic?

Probioticele sunt microorganisme vii care, administrate în cantități adecvate, aduc un beneficiu pentru sănătatea gazdei (FAO/OMS 2001; ISAPP 2014). Criteriile de selecție a unei tulpini sunt:

1. identificare la nivel de tulpină și siguranță demonstrată (nepatogen, fără gene transferabile de rezistență la antibiotice);
2. rezistență la aciditatea gastrică și la sărurile biliare;
3. aderență la mucoasa intestinală și colonizare temporară;

4. activitate antimicrobiană: acidifiere, bacteriocine, competiție pentru nutrienți și situsuri de aderență;
5. efecte benefice demonstrate prin studii clinice;
6. viabilitate și stabilitate pe durata fabricației și a depozitării.

> **PRECIZARE**
> Originea umană a tulpinii nu mai este un criteriu obligatoriu. Decisive sunt siguranța, identificarea la nivel de tulpină și beneficiul demonstrat.

Aplicații în industria farmaceutică

Probioticele de uz farmaceutic se formulează ca liofilizate (cu crioprotectori: trehaloză, lapte degresat), în capsule gastrorezistente sau în pulberi microîncapsulate. Specificația de calitate se referă la numărul de celule viabile la **sfârșitul** perioadei de valabilitate, de aceea fabricantul adaugă un exces la fabricație, calculat din studiile de stabilitate.

Farmacopeea Europeană are o monografie generală pentru **produsele bioterapeutice vii** (Live biotherapeutic products for human use, 3053), care cere identificarea tulpinii, numărarea celulelor viabile, absența microorganismelor specificate și controlul contaminanților.

Tulpină (exemple)	Domeniu cu dovezi clinice
Lacticaseibacillus rhamnosus GG	diareea asociată antibioticelor, diareea acută la copii
Saccharomyces boulardii CNCM I-745	diareea asociată antibioticelor
Limosilactobacillus reuteri DSM 17938	colicile sugarului
Escherichia coli Nissle 1917	menținerea remisiunii în colita ulcerativă

Surse frecvente de erori

- contaminare prin lucru neaseptic;
- aceeași pipetă folosită la mai multe diluții — rezultat supraestimat;
- plăci cu mai puțin de 30 sau mai mult de 300 de colonii folosite la calcul;
- absorbția CO_2 de către NaOH sau un viraj depășit;
- nescăderea acidității martorului.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — alegerea plăcii pentru numărare

Din diluția 10^{-5} (0,1 mL) cresc 215 colonii; din 10^{-6} (0,1 mL), 24 de colonii.

→ Se folosește numai placa 10^{-5} (în intervalul 30–300); placa 10^{-6} are prea puține colonii pentru un rezultat precis.

$$\text{UFC/g} = 215 / (0{,}1 \times 10^{-5}) = 2{,}15 \times 10^{8}\ \text{UFC/g}$$

EXEMPLUL 2 — excesul la fabricație

Studiul de stabilitate arată scăderea de la 5×10^{9} la 8×10^{8} UFC/capsulă în 12 luni.

$$\text{reducere} = \lg (5 \times 10^{9} / 8 \times 10^{8}) = \lg 6{,}25 = 0{,}80\ \log$$

pentru a garanta 1×10^{9} UFC la expirare: conținut inițial = $1 \times 10^{9} \times 10\text{^}0{,}80 = 6{,}3 \times 10^{9}$ UFC/capsulă

EXEMPLUL 3 — viteza de creștere a bacteriilor lactice

Între 8 h și 16 h, numărul crește de la lg N = 6,9 la lg N = 8,7.

$$\mu = (8{,}7 - 6{,}9) \times 2{,}303 / 8 = 0{,}518\ \text{h}^{-1};\quad t_d = 0{,}693 / 0{,}518 = 1{,}34\ \text{h}$$

Întrebări

1. Ce caracteristici definesc un microorganism probiotic?
2. De ce mediul MRS este selectiv pentru bacteriile lactice?
3. De ce bacteriile lactice sunt catalază-negative și ce consecință are aceasta pentru metabolismul lor?
4. De ce se scade aciditatea martorului din aciditatea probei?
5. Cum se asigură viabilitatea probioticelor într-o formă farmaceutică (capsule, liofilizate)?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Un iaurt are aciditatea 90 °T. Exprimați aciditatea în g acid lactic/L.
2. Din diluția 10^{-5} (0,1 mL) cresc 87 de colonii. Calculați UFC/g.
3. Un liofilizat scade de la 2×10^{10} la $1{,}5 \times 10^{9}$ UFC/g. Calculați reducerea logaritmică.
4. Ce volum de NaOH 0,1 M se consumă la titrarea a 10 mL probă cu 0,72 % acid lactic?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Mediul MRS este selectiv pentru bacteriile lactice datorită:**
   a) conținutului de acetat și pH-ului ușor acid
   b) absenței glucozei
   c) prezenței antibioticelor
   d) temperaturii ridicate
2. **Numărarea coloniilor este considerată precisă pentru plăcile cu:**
   a) 1–10 colonii
   b) 30–300 de colonii
   c) peste 1 000 de colonii
   d) orice număr
3. **Probioticele sunt definite ca:**
   a) microorganisme inactivate
   b) microorganisme vii care aduc un beneficiu în cantități adecvate
   c) substraturi pentru flora intestinală
   d) metaboliți bacterieni
4. **Bacteriile heterolactice produc:**
   a) numai acid lactic
   b) acid lactic, etanol și CO_2
   c) acid acetic
   d) acid propionic

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 13

Procesarea în aval: izolarea și purificarea parțială a proteinelor din lapte

Manual: *Capitolul 16 — Procesarea în aval*

Obiective

- aplicarea operațiilor de bază ale procesării în aval: separare, precipitare, spălare, uscare;
- izolarea cazeinei prin precipitare izoelectrică și fracționarea proteinelor serice prin precipitare cu sulfat de amoniu;
- calculul randamentului de etapă, al randamentului global și al bilanțului de masă.

Noțiuni teoretice

Procesarea în aval (downstream) cuprinde toate operațiile prin care produsul este separat din mediul de fabricație și adus la puritatea cerută: recoltarea și clarificarea, captura, rafinarea (îndepărtarea impurităților legate de proces și de produs), inactivarea sau îndepărtarea virusurilor și formularea finală. Ordinea etapelor nu este arbitrară: captura vine prima, pentru că reduce volumul și scoate produsul dintr-un mediu care conține proteaze; operațiile ulterioare lucrează pe volume mici și pe material din ce în ce mai curat.

Precipitarea este una dintre cele mai vechi operații de fracționare a proteinelor. La punctul izoelectric (pI), sarcina netă a proteinei este nulă, repulsia electrostatică dispare, iar proteina precipită. Sărurile în concentrație mare (sulfatul de amoniu) concurează pentru moleculele de apă și precipită proteinele în funcție de hidrofobicitatea și de mărimea lor („salting-out”).

> **CORECTURĂ — randamentul de etapă nu este randamentul global**
> Un randament de 90 % pe etapă pare ridicat. Într-un proces cu cinci etape, randamentul global este $0{,}9^5$ = 59 %. Pentru un anticorp monoclonal, randamentul global publicat al platformei de purificare este de 70–80 %. Verificarea corectă a unei etape nu este randamentul ei izolat, ci bilanțul de masă complet (produs + pierderi, raportate la intrare).

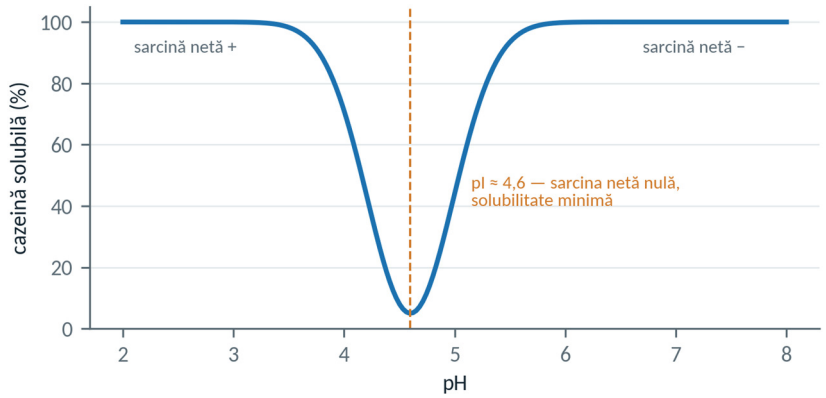


Figura 13.1. Solubilitatea cazeinei în funcție de pH: minimul la punctul izoelectric (profil orientativ).

Cantitatea de sulfat de amoniu necesară pentru a trece de la saturația S_1 la saturația S_2 (în %) se calculează, la 20 °C, cu relația empirică:

$$g\ (NH_4)_2SO_4 / L = 533 \cdot (S_2 - S_1) / (100 - 0{,}3 \cdot S_2)$$

Principiul lucrării

Laptele degresat conține aproximativ 3,3 % proteine, din care circa 80 % cazeină (pI ≈ 4,6) și 20 % proteine serice (β-lactoglobulină, α-lactalbumină, imunoglobuline, albumină serică). Acidifierea la pH 4,6 precipită cazeina (etapa de captură), care se separă prin filtrare (clarificare), se spală și se usucă. Din zer, proteinele serice se fracționează prin adăugarea sulfatului de amoniu: imunoglobulinele precipită la 50 % saturație, iar albuminele la saturație completă. Prezența proteinelor în fiecare fracție se verifică prin reacția biuretului.

Materiale și reactivi

- lapte degresat (0,1 % grăsime) — 100 mL;
- acid acetic 10 %; NaOH 0,1 M;
- sulfat de amoniu solid;
- etanol 96 %;
- reactiv biuret (sau NaOH 10 % și $CuSO_4$ 1 %);
- pahare Berzelius de 250 mL, pH-metru, agitator magnetic, baie de apă (40 °C), termometru;
- tifon, pâlnie, hârtie de filtru, pâlnie Büchner cu vas Kitasato (sau centrifugă), sticlă de ceas tarată, cântar, eprubete.

Protecția muncii

- halat, mănuși, ochelari;
- acidul acetic și NaOH sunt iritante sau corozive;
- etanolul este inflamabil — se lucrează departe de flacără.

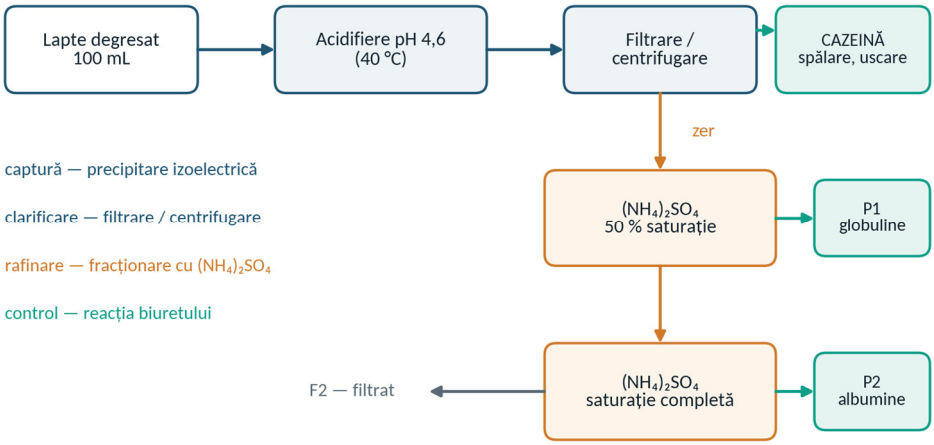


Figura 13.2. Schema de fracționare aplicată în lucrare, pe etapele procesării în aval.

Mod de lucru

1. Captura: precipitarea izoelectrică a cazeinei

1. Se încălzesc 100,0 mL lapte degresat la 40 °C.
2. Sub agitare, se adaugă acid acetic 10 % picătură cu picătură, monitorizând pH-ul, până la pH 4,6. Se formează un precipitat alb, floconos.
3. Se oprește agitarea și se lasă 5 minute pentru sedimentare.

2. Clarificarea și spălarea

1. Precipitatul se separă prin filtrare prin tifon (sau prin centrifugare, 5 minute la 3000 rpm); filtratul (zerul) se păstrează.
2. Cazeina se spală cu 2 × 20 mL apă, apoi cu 20 mL etanol 96 % (deshidratare și îndepărtarea urmelor de grăsime), pe pâlnia Büchner.
3. Se usucă pe sticla de ceas tarată, la aer sau la 40 °C, și se cântărește.

3. Rafinarea: fracționarea proteinelor serice

1. Se măsoară 20 mL zer limpede (dacă este tulbure, se filtrează din nou prin hârtie).
2. Se adaugă treptat, sub agitare, sulfat de amoniu solid până la 50 % saturație (aproximativ 0,31 g/mL la 20 °C, adică 6,3 g — vezi exemplul de calcul). Se lasă 10 minute; se filtrează — precipitatul P1 (imunoglobuline, globuline).
3. În filtrat se adaugă sulfat de amoniu până la saturație (rămâne sare nedizolvată). Se lasă 10 minute; se filtrează — precipitatul P2 (albumine), filtratul F2.

4. Controlul fracțiilor: reacția biuretului

1. În eprubete separate se introduc câte 1 mL din: lapte degresat; zer; filtratul F2; o soluție de cazeină (0,05 g dizolvată în 2 mL NaOH 0,1 M); apă (martor).

2. Se adaugă 1 mL NaOH 10 % și 2–3 picături $CuSO_4$ 1 %; se agită.
3. Coloraţia violetă indică legături peptidice. Se compară intensitatea.

> **PRECIZARE**
> În probele cu sulfat de amoniu, ionul amoniu formează cu cuprul un complex albastru intens, care poate masca parţial coloraţia violetă. Proba F2 se interpretează faţă de un martor cu soluţie saturată de sulfat de amoniu.

Calcule

Randament cazeină (%) = m cazeină uscată × 100 / (V lapte × 0,027 g/mL)

Randament global = produsul randamentelor de etapă

Exercițiu: un proces de purificare are cinci etape, cu randamentele 95 %, 90 %, 92 %, 88 % și 97 %. Calculați randamentul global și identificați etapa care trebuie optimizată prima.

> **EXEMPLU DE CALCUL — sulfatul de amoniu**
> 0 → 50 %: 533 × 50 / (100 − 15) = 313 g/L → pentru 20 mL zer: 6,3 g
> 50 → 100 %: 533 × 50 / (100 − 30) = 381 g/L → pentru ≈ 22 mL: 8,4 g

> **EXEMPLU DE CALCUL — randament și bilanț**
> Cazeină teoretică: 100 mL × 0,027 g/mL = 2,70 g. Cazeină uscată obținută: 2,41 g.
> Randament de etapă = 2,41 × 100 / 2,70 = 89,3 %
> Proces în cinci etape, cu randamentele 95, 90, 92, 88 și 97 %:
> η global = 0,95 × 0,90 × 0,92 × 0,88 × 0,97 = 0,671 → 67,1 %
> **→ Etapa de 88 % trebuie optimizată prima: creșterea ei la 95 % ridică randamentul global la 72,5 %.**

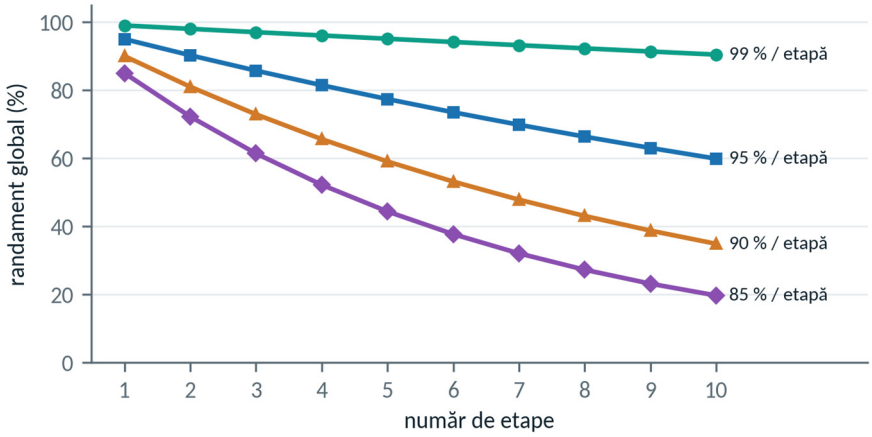


Figura 13.3. Randamentul global în funcție de numărul de etape și de randamentul pe etapă.

Rezultate

Fracție	Operație	Masă / volum	Aspect	Biuret (−/+/++/+++)
Lapte degresat	materie primă	100,0 mL		
Cazeină	precipitare la pH 4,6			
Zer	filtrat după captură			
P1	50 % saturație $(NH_4)_2SO_4$			
P2	saturație completă			
F2	filtrat final			

Cazeină teoretică (g)	Cazeină obținută (g)	Randament (%)	Observații
2,7			

Aplicații în industria farmaceutică

Etapă	Operație tipică (anticorp monoclonal)	Ce îndepărtează
Recoltare și clarificare	centrifugare + filtrare în adâncime	celule, fragmente celulare
Captură	cromatografie de afinitate pe proteina A	majoritatea proteinelor celulei-gazdă (HCP)
Inactivare virală	incubare la pH ≈ 3,5, 60 de minute	virusuri cu anvelopă
Rafinare	cromatografie de schimb ionic, de interacțiuni hidrofobe	agregate, HCP și ADN reziduale, proteina A desprinsă
Nanofiltrare virală	filtre de ≈ 20 nm	virusuri mici fără anvelopă
Ultrafiltrare / diafiltrare	membrane de 30 kDa	schimb de tampon, concentrare la formularea finală

Precipitarea fracționată rămâne importantă industrial în **fracționarea plasmei**: procesul Cohn separă albumina, imunoglobulinele și factorii de coagulare prin adăugarea treptată de etanol la temperaturi joase și pH controlat. Siguranța virală a unui proces se exprimă prin factorul de reducere logaritmică (LRV), însumat pe etapele independente.

$$\text{LRV} = \lg(\text{încărcătură virală la intrare} / \text{încărcătură virală la ieșire})$$

Surse frecvente de erori

- depășirea pH-ului 4,6 la acidifiere — cazeina se redizolvă parțial;
- adăugarea prea rapidă a sării — precipitare locală, neuniformă;
- timp prea scurt de precipitare;
- pierderi de precipitat la spălare și transfer;
- cazeina insuficient uscată — randament aparent crescut.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — sulfatul de amoniu între două trepte de saturație

De la 30 % la 60 % saturație, pentru 50 mL soluție, la 20 °C:

g/L = 533 × (60 − 30) / (100 − 0,3 × 60) = 15 990 / 82 = 195 g/L → pentru 50 mL: 9,75 g

EXEMPLUL 2 — bilanțul de masă al unei etape de captură

Intrare: 500 mg proteină țintă. Eluat (produs): 410 mg; fracția nereținută: 55 mg; spălare: 20 mg.

randament de etapă = 410 / 500 = 82 %; bilanț = (410 + 55 + 20) / 500 = 97 %

→ Bilanțul de 97 % arată că pierderile sunt explicate; 11 % din produs se pierde în fracția nereținută — coloana poate fi supraîncărcată.

EXEMPLUL 3 — factorul de concentrare și LRV

Recoltă: 10 L cu 1,5 g/L anticorp. După captură: 0,8 L cu 17 g/L.

randament = 0,8 × 17 / (10 × 1,5) = 13,6 / 15 = 90,7 %; factor de concentrare = 17 / 1,5 = 11,3

Inactivarea virală scade titrul de la 10^7,2 la 10^2,5 unități infecțioase: LRV = 7,2 − 2,5 = 4,7.

Întrebări

1. Ce este punctul izoelectric și de ce o proteină are solubilitate minimă la acest pH?
2. Prin ce diferă precipitarea izoelectrică de precipitarea cu săruri?
3. Care sunt etapele unui proces de purificare a unui anticorp monoclonal și de ce ordinea lor nu poate fi schimbată?
4. De ce randamentul global scade rapid cu numărul de etape?
5. Ce impurități trebuie îndepărtate dintr-un produs biologic (legate de proces și legate de produs)?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. Câte grame de sulfat de amoniu se adaugă la 30 mL soluție pentru a ajunge de la 0 la 40 % saturație (20 °C)?
2. Un proces are 6 etape, fiecare cu randament de 92 %. Calculați randamentul global.
3. Din 100 mL lapte (2,70 g cazeină teoretic) se obțin 2,55 g cazeină. Calculați randamentul.
4. Trei etape independente au LRV de 4,7; 3,5 și 4,0. Care este LRV total al procesului?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **La punctul izoelectric, o proteină are:**
   a) sarcină netă maximă
   b) sarcină netă nulă și solubilitate minimă
   c) solubilitate maximă
   d) structură denaturată
2. **„Salting-out” se realizează cel mai frecvent cu:**
   a) clorură de sodiu diluată
   b) sulfat de amoniu
   c) uree
   d) etanol
3. **Etapa de captură pentru anticorpii monoclonali folosește:**
   a) proteina A
   b) schimb anionic
   c) filtrare sterilizantă
   d) precipitare cu etanol

4. **Randamentul global pentru 5 etape a câte 90 % este aproximativ:**
   a) 90 %
   b) 75 %
   c) 59 %
   d) 45 %

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 14

Buna practică de fabricație și producția aseptică: monitorizarea microbiologică a mediului și a operatorului

Manual: *Capitolul 17 — Buna practică de fabricație; Capitolul 18 — Producția aseptică*

Obiective

- evaluarea contaminării microbiene a aerului, a suprafețelor și a mâinilor prin metodele folosite în monitorizarea de mediu;
- compararea rezultatelor cu limitele de acțiune din Anexa 1 a ghidului GMP al Uniunii Europene;
- înregistrarea datelor conform principiilor de integritate a datelor (ALCOA+).

Noțiuni teoretice

Buna practică de fabricație (GMP) pornește de la principiul că o calitate nu se poate verifica exclusiv pe produsul finit: ea trebuie construită în proces. În producția sterilă, sursa dominantă de contaminare este operatorul, care emite continuu particule și microorganisme, cu atât mai mult cu cât se mișcă. Anexa 1 (revizuită în 2022, aplicabilă din 25 august 2023) clasifică zonele curate în clasele A–D și impune monitorizarea microbiologică a aerului, a suprafețelor și a personalului, cu puncte de prelevare stabilite prin evaluarea riscului.

Clasă	Aer (UFC/m³)	Plăci de sedimentare, Ø 90 mm (UFC/4 h)	Plăci de contact, Ø 55 mm (UFC/placă)	Amprentă mănușă, 5 degete (UFC/mănușă)
A	nicio creștere	nicio creștere	nicio creștere	nicio creștere
B	10	5	5	5
C	100	50	25	—
D	200	100	50	—

> **CORECTURĂ — „nicio creștere” nu este „mai puțin de unu”**
> Versiunea din 2008 a Anexei 1 prevedea pentru clasa A limita „< 1 UFC”. Versiunea din 2022 a înlocuit-o cu „nicio creștere”, iar orice creștere detectată în clasa A declanșează o investigație. Tabelul se numește acum „limite de acțiune”, nu „limite recomandate”.

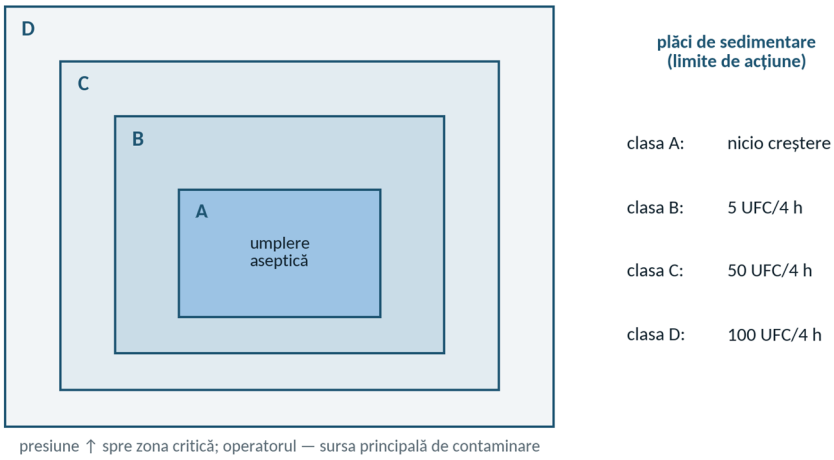


Figura 14.1. Organizarea zonelor curate în jurul operației critice și limitele de acțiune pentru plăcile de sedimentare.

Monitorizarea de mediu nu demonstrează sterilitatea produsului, ci arată dacă mediul în care acesta este fabricat rămâne sub control. Rezultatele se urmăresc în timp (analiză de tendință): o creștere sistematică, chiar sub limita de acțiune, este semnalul care declanșează investigația. Pe lângă limitele de acțiune, fiecare fabricant stabilește limite de alertă, mai strânse, pe baza datelor istorice.

Principiul lucrării

Microorganismele din aer se depun pe plăci cu mediu nutritiv expuse deschise (plăci de sedimentare). Cele de pe suprafețe și de pe mâini se transferă prin contact direct pe agar. După incubare, coloniile se numără și se exprimă în unități formatoare de colonii (UFC). Comparația înainte și după dezinfecție arată eficiența măsurilor de igienă.

Materiale și reactivi

- plăci Petri de 90 mm cu agar triptonă-soia (TSA);
- plăci de contact de 55 mm cu TSA și neutralizanți (lecitină, polisorbat 80) — sau tampoane sterile umezite în ser fiziologic steril;
- opțional: plăci cu agar Sabouraud, pentru fungi;
- etanol 70 %, soluție hidroalcoolică pentru mâini, săpun;
- mănuși sterile, marker, cronometru, incubatoare (30–35 °C și 20–25 °C);
- dacă există: hotă cu flux laminar.

Protecția muncii

- după incubare, plăcile se examinează fără a fi deschise;
- toate plăcile se autoclavează înainte de eliminare;
- etanolul și soluția hidroalcoolică sunt inflamabile.

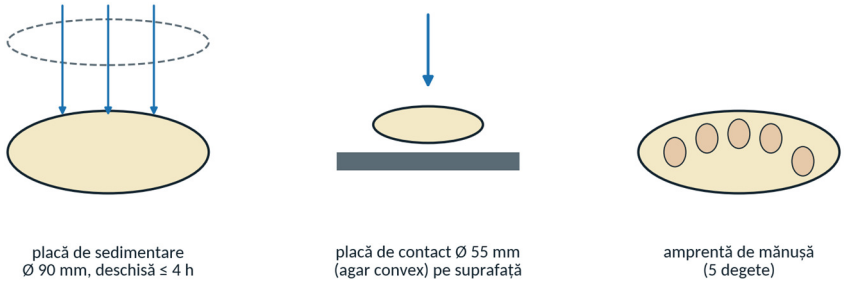


Figura 14.2. Metodele de prelevare folosite în lucrare.

Mod de lucru

1. Aerul: plăci de sedimentare

1. Plăcile se etichetează pe fund (locul, data, ora, operatorul).
2. Se expun deschise, cu capacul întors alături, 1 oră, în trei puncte: pe masa de lucru din laborator, lângă ușă sau pe culoar și în interiorul hotei cu flux laminar (în funcțiune).
3. Se închid și se notează ora închiderii.

2. Suprafețele: înainte și după dezinfecție

1. Pe masa de lucru se aplică o placă de contact, apăsând uniform 10 secunde (sau se tamponează o suprafață de 25 cm^2 și se întinde tamponul pe o placă TSA).
2. Suprafața se dezinfectează cu etanol 70 % și se lasă 2 minute să acționeze.
3. Se prelevă din zona alăturată, cu o nouă placă.

3. Mâinile operatorului: amprenta celor cinci degete

1. Fiecare student împarte fundul unei plăci TSA în patru sectoare.
2. Sectorul 1: vârfurile degetelor apăsate ușor pe agar, înainte de spălare.
3. Sectorul 2: după spălarea cu apă și săpun, 30 de secunde.
4. Sectorul 3: după frecarea cu soluție hidroalcoolică până la uscare.
5. Sectorul 4: cu mănușă sterilă, dezinfectată cu etanol 70 %.

4. Incubarea și citirea

1. Plăcile se incubează cu capacul în jos, la 30–35 °C, 48–72 de ore (opțional, plăcile Sabouraud la 20–25 °C, 5 zile).
2. Se numără coloniile și se descriu morfologic (bacterii, fungi filamentoși).
3. Rezultatele plăcilor de sedimentare se raportează la 4 ore: UFC/4 h = UFC × 4 / timp de expunere (h).

ÎNREGISTRAREA DATELOR — ALCOA+

Rezultatele se înregistrează ca într-un document GMP: atribuibile (cine a făcut determinarea), lizibile, contemporane (în momentul observației), originale și exacte; în plus, complete, consecvente, durabile și disponibile. Corecturile se fac prin tăiere cu o linie, astfel încât valoarea inițială să rămână lizibilă, cu semnătură și dată; nu se folosește corectorul.

Calcule

$$\text{UFC/4 h} = \text{UFC numărate} \times 4 / \text{timp de expunere (h)}$$

$$\text{Reducere logaritmică} = \lg(\text{UFC înainte} / \text{UFC după}); \quad \text{reducere (\%)} = (1 - \text{UFC după} / \text{UFC înainte}) \times 100$$

EXEMPLU DE CALCUL

Placă de sedimentare pe masa de lucru, expusă 1 h: 14 UFC.

$\text{UFC/4 h} = 14 \times 4 / 1 = 56$ UFC/4 h → depășește limita clasei C (50), respectă limita clasei D (100)

Placă în hota cu flux laminar, expusă 1 h: 0 UFC → compatibil cu cerința „nicio creștere” pentru această determinare.

Suprafață: 85 UFC înainte și 3 UFC după dezinfecția cu etanol 70 %.

Reducere logaritmică = $\lg(85 / 3) = \lg 28{,}3 = 1{,}45$; reducere = $(1 - 3/85) \times 100 = 96{,}5$ %

→ O reducere de 1,45 log este insuficientă pentru o zonă aseptică: dezinfectanții calificați trebuie să asigure, de regulă, cel puțin 3–4 log în testele de eficacitate.

Rezultate

Punct de prelevare	Metodă	UFC numărate	UFC raportate	Clasa cu care este compatibil
Masa de lucru	sedimentare, 1 h			
Ușă / culoar	sedimentare, 1 h			
Hotă cu flux laminar	sedimentare, 1 h			
Masă — înainte de dezinfecție	contact			
Masă — după dezinfecție	contact			

Mâini	Nespălate	Apă și săpun	Soluție hidroalcoolică	Mănușă sterilă dezinfectată
UFC / 5 degete				

Interpretare

- Aerul laboratorului obișnuit depășește de regulă limitele claselor B și C; hota cu flux laminar reduce semnificativ contaminarea.
- Dezinfecția suprafețelor cu etanol 70 % reduce numărul de UFC, dar nu sterilizează.
- Frecarea cu soluție hidroalcoolică este mai eficientă decât spălarea simplă; mănușa sterilă dezinfectată se apropie de cerința „nicio creștere".

Aplicații în industria farmaceutică

Anexa 1 cere o **strategie de control al contaminării** (CCS), un document unic care descrie toate măsurile — proiectarea spațiilor, fluxurile de personal și materiale, utilitățile, curățenia și dezinfecția, monitorizarea — și modul în care acestea se completează. Monitorizarea microbiologică se asociază cu numărarea particulelor totale:

Clasă	Particule ≥ 0,5 µm/m³ — în repaus	Particule ≥ 0,5 µm/m³ — în funcționare	Echivalent ISO 14644-1 (în funcționare)
A	3 520	3 520	ISO 5
B	3 520	352 000	ISO 7
C	352 000	3 520 000	ISO 8
D	3 520 000	nepredeterminat	—

Procesul aseptic se validează prin **simularea procesului aseptic** (media fill): în locul produsului se umple mediu de cultură (bulion triptonă-soia), cu aceleași operații și intervenții, iar unitățile se incubează și se inspectează. Validarea inițială cuprinde trei simulări consecutive reușite, apoi simularea se repetă de două ori pe an pentru fiecare linie; ținta este zero unități contaminate.

Surse frecvente de erori

- plăci expuse mai mult de 4 ore — agarul se usucă;
- contaminarea plăcilor în timpul manipulării sau al etichetării;
- lipsa neutralizanților în plăcile de contact după dezinfecție — rezultate fals negative;
- temperatura sau durata de incubare greșite;
- înregistrări incomplete sau corectate ilizibil.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — expunere diferită de 4 ore

Placă de sedimentare expusă 2,5 h: 9 UFC.

UFC/4 h = 9 × 4 / 2,5 = 14,4 → compatibil cu clasa C (≤ 50), nu cu clasa B (≤ 5)

EXEMPLUL 2 — simularea procesului aseptic

Se umplu 8 000 de unități; după incubare, una este contaminată.

frecvența de contaminare = 1 / 8 000 = 0,0125 %

→ Conform Anexei 1 (2022), ținta este zero unități contaminate: orice unitate contaminată înseamnă o simulare nereușită, se investighează cauza, iar linia nu reia producția aseptică până la repetarea cu succes a simulării.

EXEMPLUL 3 — particule și eficiența dezinfectantului

Un contor de particule arată 2 850 particule ≥ 0,5 µm/m^3 în funcționare → sub 3 520: compatibil cu clasa A.

În testul de eficacitate, un dezinfectant reduce o suspensie de la 10^6 la 10^2 UFC:

reducere logaritmică = 6 − 2 = 4 log (99,99 %)

Întrebări

1. De ce operatorul este principala sursă de contaminare în zona aseptică?
2. Ce diferență există între clasificarea unei camere curate și monitorizarea ei?
3. De ce testul de sterilitate al produsului finit nu poate demonstra singur sterilitatea unei serii?
4. Ce înseamnă ALCOA+ și de ce este integritatea datelor o cerință GMP?
5. Ce este simularea procesului aseptic (media fill) și ce demonstrează ea?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. O placă de sedimentare expusă 3 h are 30 UFC. Calculați UFC/4 h și încadrați.
2. O placă de contact dintr-o zonă de clasă B are 8 UFC. Interpretați.
3. Un dezinfectant reduce contaminarea de la 3,2 × 10^5 la 45 UFC. Calculați reducerea logaritmică.
4. O probă de aer de 1 m^3 are 150 UFC. Cu ce clasă este compatibilă?

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Limita de acțiune pentru plăcile de sedimentare în clasa A este:**
   a) < 1 UFC
   b) nicio creştere
   c) 5 UFC/4 h
   d) 10 UFC/4 h
2. **Durata maximă de expunere a unei plăci de sedimentare este:**
   a) 1 h
   b) 4 h
   c) 8 h
   d) 24 h
3. **Simularea procesului aseptic se realizează cu:**
   a) produsul finit
   b) mediu de cultură în locul produsului
   c) apă pentru preparate injectabile
   d) soluție de dezinfectant
4. **ALCOA înseamnă că datele sunt:**
   a) anonime, lizibile, complete, originale, aprobate
   b) atribuibile, lizibile, contemporane, originale, exacte
   c) arhivate, legale, confidențiale, oficiale, auditate
   d) automate, locale, corecte, obiective, aprobate

LUCRAREA PRACTICĂ NR. 15

Tehnici de cultivare și conservare a culturilor celulare in vitro, cu aplicații în industria farmaceutică

Manual: *Capitolul 10 — Culturi celulare animale și vegetale; Capitolul 15 — Procesarea în amonte*

Obiective

1. însușirea regulilor de bază privind manipularea, menținerea și stocarea culturilor celulare;
2. decongelarea celulelor crioconservate și cultivarea lor în condiții aseptice;
3. subcultivarea celulelor aderente cu tripsină-EDTA și numărarea celulelor viabile prin excluderea albastrului de tripan;
4. însămânțarea celulelor în plăci cu godeuri, la densitatea celulară dorită;
5. pregătirea celulelor pentru crioconservare.

Noțiuni teoretice

Culturile de celule de mamifer sunt modele experimentale in vitro care permit evaluarea efectelor biologice ale unor compuși și condiții de tratament în afara organismului viu. Ele au o valoare importantă în predicția răspunsului in vivo și sunt, în același timp, platforma de producție a majorității medicamentelor biologice.

După origine, se deosebesc **culturile primare**, obținute direct din fragmente de țesut, și **liniile celulare**. O cultură primară își păstrează acest statut până la prima subcultivare; după aceea devine linie celulară, cu capacitate de proliferare limitată (**linie finită**, care intră în senescență după un număr determinat de dublări) sau nelimitată (**linie continuă**, imortalizată spontan, prin transformare tumorală sau prin modificare genetică).

După modul de creștere, celulele sunt **aderente** — au nevoie de o suprafață de atașare pentru a se multiplica — sau cresc **în suspensie**, în mediul lichid. După organizare, culturile pot fi **bidimensionale (2D)**, în monostrat, sau **tridimensionale (3D)**: sferoide, organoide, culturi pe suporturi. Un grup aparte îl formează culturile derivate din celule stem. Alegerea modelului celular depinde de scopul experimentului și de țintele biologice urmărite.

Criteriu	Tip	Exemple
Origine	cultură primară	fibroblaste, hepatocite izolate din țesut
	linie finită (diploidă)	MRC-5, WI-38 — substrat pentru vaccinuri
	linie continuă	HeLa, CHO, Vero, HEK293
Mod de creștere	aderentă	Vero, Caco-2, HepG2
	în suspensie	CHO și HEK293 adaptate la suspensie, linii hematopoietice
Organizare	2D (monostrat)	culturi în flask sau în plăci
	3D	sferoide, organoide

Menținerea liniilor celulare impune condiții adaptate biologiei lor: un **mediu de cultură** adecvat (de exemplu DMEM, RPMI 1640 sau MEM, suplimentat de regulă cu 10 % ser fetal bovin și L-glutamină), **37 °C**, atmosferă umedă cu **5 % CO_2** (CO_2 menține, împreună cu bicarbonatul din mediu, pH-ul de 7,2–7,4) și subcultivare regulată. Roșul de fenol din mediu indică vizual pH-ul: virajul spre galben semnalează acidifierea (epuizarea mediului sau contaminare bacteriană), iar virajul spre violet, alcalinizarea. Manipularea se face numai în condiții aseptice, cu urmărirea morfologiei și a semnelor de contaminare.

La culturile aderente, subcultivarea presupune detașarea celulelor de pe suprafața de cultivare, de regulă cu **tripsină-EDTA**: tripsina scindează proteinele de adeziune, iar EDTA chelatează ionii Ca^{2+} și Mg^{2+} necesari adeziunii celulă–celulă și celulă–substrat. Numărul de celule viabile din suspensie permite calculul volumului necesar pentru însămânțarea în flaskuri noi sau în plăci cu godeuri. Momentul optim al subcultivării este faza exponențială, la o confluență de 70–80 % (figura 15.1); la confluență completă, celulele aderente se opresc din diviziune prin inhibiție de contact.

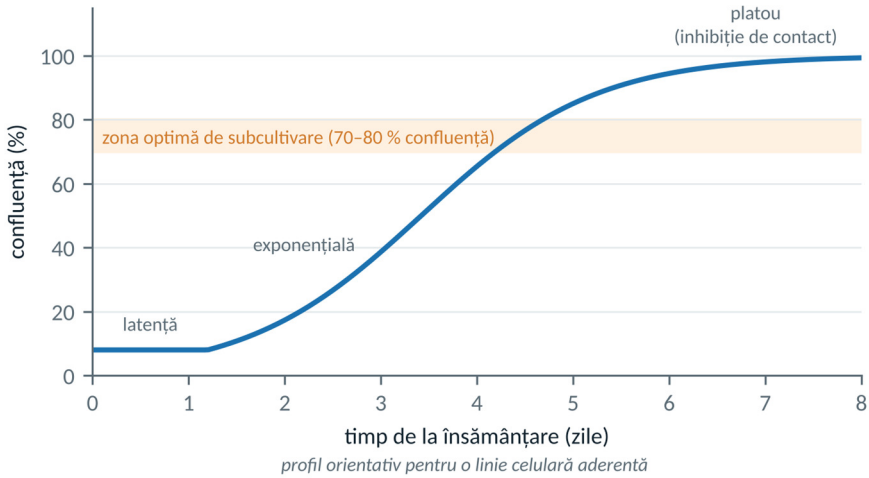


Figura 15.1. Evoluția confluenței unei culturi aderente și momentul optim al subcultivării.

Crioconservarea permite păstrarea unor stocuri de celule pentru utilizare ulterioară. Celulele se suspendă într-un mediu de congelare cu un crioprotector — de obicei **dimetilsulfoxid (DMSO) 5–10 %** — care reduce formarea cristalelor de gheață intracelulare, apoi se răcesc lent, cu aproximativ **1 °C pe minut**, până la −80 °C. Pentru păstrarea pe termen lung, criovialele se transferă în **azot lichid** (−196 °C) sau în faza de vapori a acestuia (sub −150 °C). Decongelarea, dimpotrivă, trebuie să fie **rapidă**, iar DMSO se îndepărtează imediat, deoarece la temperatura camerei este toxic pentru celule.

> **REGULA DE AUR A CRIOBIOLOGIEI**
> Congelare lentă, decongelare rapidă. Răcirea lentă permite apei să părăsească celula înainte de înghețare; încălzirea rapidă împiedică recristalizarea gheții în timpul decongelării.

Principiul lucrării

Lucrarea se bazează pe disocierea enzimatică a celulelor aderente sub acțiunea proteolitică a tripsinei-EDTA, care le detașează de pe suprafața de cultivare. După obținerea unei suspensii cu densitatea celulară dorită, celulele sunt transferate într-un recipient nou, unde aderă și își reiau proliferarea. Numărul de celule viabile se determină în camera de numărat, prin excluderea albastrului de tripan: celulele cu membrana intactă nu preiau colorantul. Pentru stocarea pe termen lung, celulele se crioconservă în prezența DMSO, care previne leziunile produse de gheață și permite recuperarea celulelor cu capacitate de proliferare după decongelare.

PROTECȚIA MUNCII

Halat, mănuși, ochelari de protecție. Culturile se manipulează în cabinetul de siguranță biologică de clasa II (hotă cu flux laminar vertical), care protejează atât cultura, cât și operatorul; liniile de origine umană se tratează ca potențial infecțioase (nivel 2 de biosiguranță).

Azotul lichid produce arsuri criogenice și, în spații închise, poate provoca asfixie; se folosesc mănuși criogenice și vizieră. Criovialele scoase din faza lichidă pot exploda la încălzire bruscă dacă au pătruns azot.

DMSO traversează ușor pielea și poate transporta alte substanțe — se evită contactul direct. Reactivii se manipulează conform fișelor cu date de securitate. Deșeurile se colectează ca deșeuri biologice și se inactivează (autoclavare) înainte de eliminare.

Materiale și reactivi

Echipamente

- cabinet de siguranță biologică de clasa II;
- incubator pentru culturi celulare (37 °C, 5 % CO_2, umiditate);
- microscop inversat;
- centrifugă pentru tuburi de 15 mL;
- baie de apă la 37 °C;
- congelator la −80 °C și recipient pentru răcire controlată (≈ −1 °C/min);
- vas Dewar sau container cu azot lichid.

Consumabile

- flaskuri sterile pentru culturi, de 25 și 75 cm^2;
- plăci sterile cu 24 sau 96 de godeuri;
- tuburi sterile de centrifugare, de 15 mL;
- crioviale de 1,8–2 mL;
- pipete serologice și dispozitiv de pipetare; pipete automate și vârfuri sterile;
- hemocitometru (cameră Neubauer) cu lamelă;
- recipiente pentru deșeuri biologice.

Reactivi

- mediu de cultură specific liniei celulare, cu suplimenții necesari (ser fetal bovin, L-glutamină);
- soluție salină tamponată cu fosfat, formula Dulbecco, fără Ca^{2+} și Mg^{2+} (D-PBS);
- tripsină-EDTA (0,05–0,25 %);
- albastru de tripan 0,4 %;
- dimetilsulfoxid (DMSO) de calitate pentru culturi celulare;
- etanol 70 %.

Mod de lucru

1. Decongelarea celulelor crioconservate

1. Se preîncălzește mediul complet la 37 °C. Într-un flask de 25 cm^2 se introduc aproximativ 5 mL mediu, iar flaskul se pune în incubator cu circa 15 minute înainte de decongelare, pentru echilibrarea temperaturii și a pH-ului.
2. Criovialul se scoate din azot lichid (mănuși criogenice, vizieră) și se decongelează rapid în baia de apă la 37 °C, cu agitare ușoară, timp de 1–2 minute, până când rămâne doar un mic cristal de gheață. Capacul nu se scufundă în apă.
3. Criovialul se decontaminează prin pulverizare cu etanol 70 % și se transferă în cabinetul de siguranță biologică.
4. Conținutul se transferă, picătură cu picătură, într-un tub de 15 mL cu aproximativ 9 mL mediu preîncălzit — DMSO se diluează astfel de cel puțin zece ori.
5. Suspensia se centrifughează la turația și timpul recomandate pentru linia respectivă (de regulă 125–300 × g, 5 minute).
6. Supernatantul cu DMSO se îndepărtează, peletul se resuspendă ușor, prin pipetare, în mediu proaspăt, iar suspensia se transferă în flaskul pregătit.
7. Flaskul se incubează în condițiile specifice liniei; majoritatea liniilor necesită 37 °C și 5 % CO_2. A doua zi se verifică aderarea și se schimbă mediul.

Pe flask se notează data decongelării, denumirea liniei celulare și numărul pasajului.

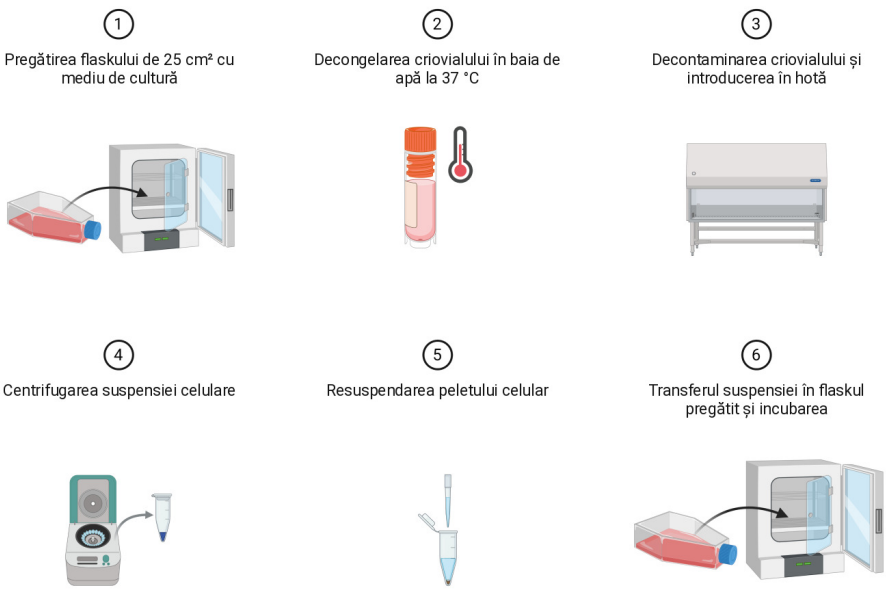


Figura 15.2. Etapele decongelării unei linii celulare.

2. Subcultivarea celulelor aderente

1. Cultura se examinează la microscop: confluență de 70–80 %, morfologie caracteristică, absența semnelor de contaminare.
2. Se îndepărtează mediul din flask.
3. Stratul celular se clătește cu 2–4 mL D-PBS fără Ca^{2+} și Mg^{2+}, care se aruncă. Clătirea îndepărtează serul, care conține inhibitori ai tripsinei; unele protocoale folosesc pentru clătire un volum mic de tripsină-EDTA.
4. Se adaugă 1–1,5 mL tripsină-EDTA (pentru un flask de 25 cm^2), astfel încât să acopere stratul celular, și se incubează la 37 °C. Detașarea se urmărește la microscop; durata este specifică liniei, de obicei 2–10 minute (până la 15 minute pentru liniile foarte aderente).
5. După detașare se adaugă cel puțin 3 mL mediu complet, care neutralizează tripsina; suspensia se pipetează ușor pentru desfacerea agregatelor și se transferă într-un tub de centrifugare.
6. Se prelevă un volum mic din suspensie pentru numărarea celulelor (punctul 3).
7. Suspensia se centrifughează la turația și timpul recomandate pentru linie; supernatantul se aruncă.
8. Peletul se resuspendă în mediu proaspăt, iar celulele se transferă într-un flask de 75 cm^2 cu 12–15 mL mediu, la densitatea sau raportul de diviziune recomandat (de exemplu 1 : 3 – 1 : 6). Flaskul se incubează; când cultura atinge din nou 70–80 % confluență, subcultivarea se repetă.

Pe flask se notează data subcultivării, denumirea liniei celulare și numărul pasajului (crescut cu o unitate).



Figura 15.3. Etapele subcultivării unei linii celulare aderente.

3. Numărarea celulelor prin excluderea albastrului de tripan

1. Se amestecă 10 µL suspensie celulară omogenizată cu 10 µL albastru de tripan 0,4 % (diluție 1 : 2).
2. Se încarcă 10 µL din amestec sub lamela hemocitometrului, prin capilaritate, fără bule și fără a supraîncărca camera.
3. În 3–5 minute de la amestecare (expunerea prelungită colorează și celulele viabile) se numără, la microscop, celulele viabile (necolorate, refringente) și cele moarte (albastre) din cele 4 pătrate mari de colț (figura 15.4).
4. Se calculează concentrația celulelor viabile și viabilitatea (vezi Calcule). Pentru o numărare exactă, fiecare pătrat trebuie să conțină aproximativ 20–100 de celule; altfel suspensia se diluează sau se concentrează.

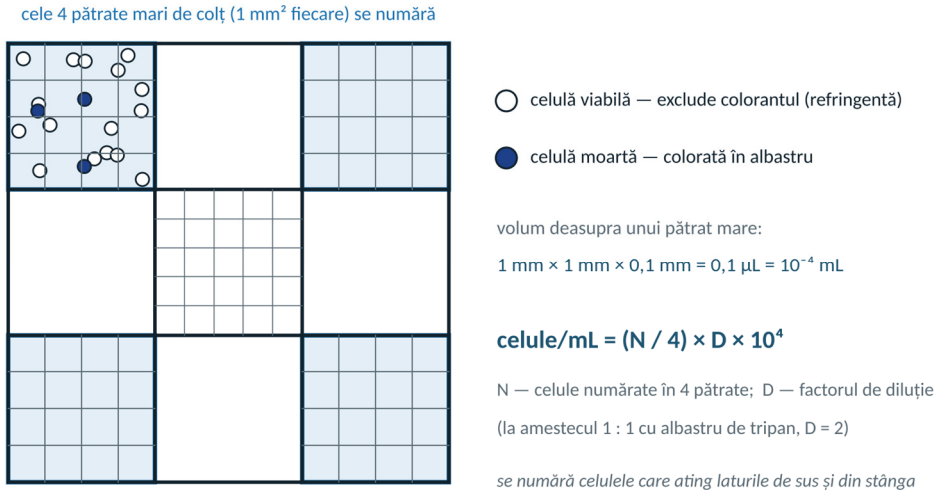


Figura 15.4. Hemocitometrul Neubauer: pătratele numărate și relația de calcul.

4. Însămânțarea celulelor în plăci cu godeuri

1. Se efectuează etapele subcultivării; o parte din suspensia celulară care nu este introdusă în flask se folosește pentru plăci.
2. Se alege tipul de placă potrivit scopului experimentului și se etichetează cu data însămânțării, denumirea liniei și pasajul.
3. Se stabilește densitatea celulară, exprimată în celule/godeu, potrivită experimentului (de exemplu 5 000–10 000 celule/godeu în plăcile de 96 de godeuri pentru testele de viabilitate) și se numără celulele.
4. Un volum calculat de suspensie se diluează cu mediu de cultură, astfel încât să asigure atât volumul pe godeu (de exemplu 100 µL/godeu în plăcile de 96 de godeuri), cât și densitatea stabilită.
5. Suspensia diluată se distribuie în volume egale în godeuri, omogenizând-o frecvent, pentru a evita sedimentarea celulelor. La plăcile de 96 de godeuri, godeurile de pe margine primesc numai mediu (sau D-PBS), în același volum — se reduce astfel „efectul de margine”, produs de evaporarea mai rapidă.

6. Placa se incubează în condițiile specifice liniei. A doua zi se examinează la microscop aderarea și confluența.

După atingerea confluenței dorite, celulele din plăci se expun, pe intervale de timp stabilite (de exemplu 24, 48 și 72 de ore), la compușii de interes.

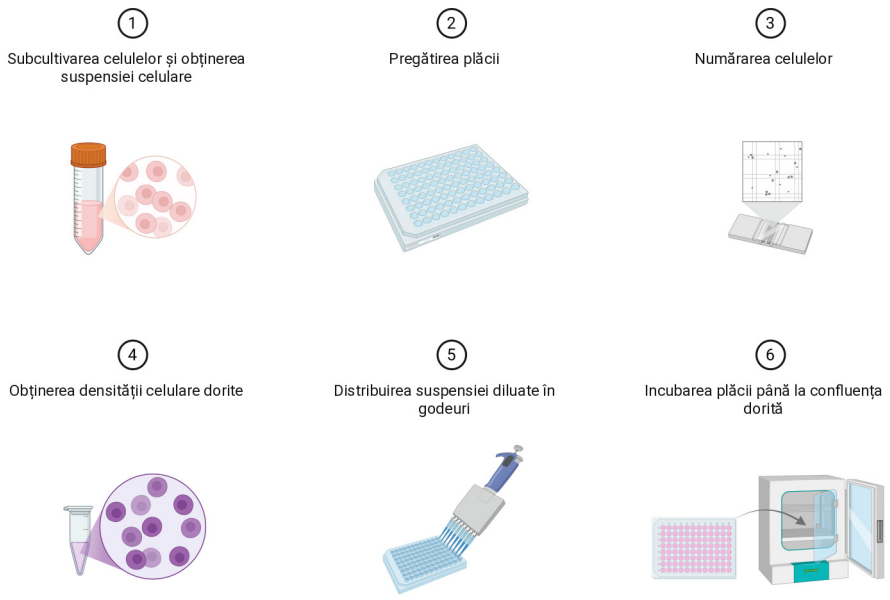


Figura 15.5. Etapele cultivării celulelor în plăci cu godeuri.

5. Pregătirea celulelor pentru crioconservare

1. Se efectuează etapele subcultivării pe o cultură aflată în faza exponențială, cu viabilitate de peste 90 %; o parte din suspensie se folosește pentru congelare.
2. Se stabilește, în funcție de linia celulară, numărul de celule congelate per criovial, exprimat ca celule/mL (de obicei 1×10^6 – 5×10^6 celule/mL), și se numără celulele.
3. Volumul de suspensie care conține numărul necesar de celule se centrifughează, iar peletul se resuspendă în mediul de congelare rece — de exemplu mediu complet sau ser fetal bovin cu 5–10 % DMSO. Alternativ, peste suspensia din criovial se adaugă volumul de DMSO corespunzător concentrației finale dorite, cu omogenizare imediată.
4. Se repartizează câte 1 mL în crioviale etichetate (linie, pasaj, număr de celule, data, operatorul); criovialele se închid etanș.
5. Criovialele se pun imediat în recipientul pentru răcire controlată (≈ −1 °C/min) și se păstrează la −80 °C timp de 24 de ore.
6. Pentru depozitarea pe termen lung, criovialele se mută în containerul cu azot lichid (−196 °C) sau în faza de vapori (sub −150 °C), iar poziția lor se înregistrează în evidența stocurilor.

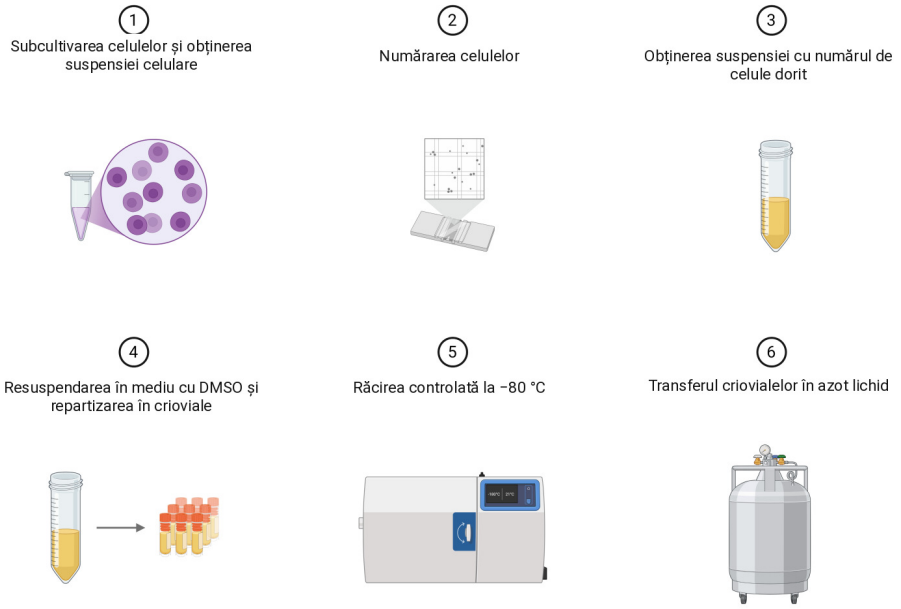


Figura 15.6. Etapele congelării și conservării pe termen lung a unei linii celulare.

Calcule

Celule/mL = (N / 4) × D × 10^4 (N — celule numărate în 4 pătrate mari; D — factor de diluție)

Viabilitate (%) = celule viabile × 100 / (celule viabile + celule moarte)

V suspensie (mL) = număr de celule necesar / concentrația celulelor viabile (celule/mL)

Număr de dublări ale populației: PD = $\log_2$ (N final / N inițial) = 3,32 × lg (N final / N inițial); t d = t / PD

EXEMPLU DE CALCUL — numărarea celulelor

Amestec 1 : 1 cu albastru de tripan (D = 2). În cele 4 pătrate mari: celule viabile 52, 48, 55, 45 (total 200); celule moarte 4, 6, 3, 7 (total 20).

concentrația celulelor viabile = (200 / 4) × 2 × 10^4 = 1,0 × 10^6 celule/mL

viabilitate = 200 × 100 / (200 + 20) = 90,9 %

→ Suspensia de 5 mL conține 5,0 × 10^6 celule viabile; viabilitatea de peste 90 % permite atât subcultivarea, cât și crioconservarea.

Rezultate

Pătrat	1	2	3	4	Total
Celule viabile					
Celule moarte					

Concentrație viabile (celule/mL)	Viabilitate (%)	Volum total suspensie (mL)	Număr total de celule viabile

Utilizare	Celule necesare	Volum suspensie (mL)	Volum mediu (mL)	Observații
Flask 75 cm^2				
Placă cu godeuri				
Crioviale				

Interpretare

- O viabilitate sub 80–85 % indică o cultură suferindă (confluență excesivă, mediu epuizat, tripsinizare prelungită) și recomandă amânarea experimentelor.
- După decongelare, aderarea și aspectul normal al celulelor în primele 24 de ore confirmă reușita crioconservării.
- Neuniformitatea creșterii în godeuri indică omogenizare insuficientă a suspensiei sau efect de margine.

Aplicații în industria farmaceutică

Culturile de celule de mamifer au aplicații importante atât în cercetarea farmaceutică, cât și în industria biofarmaceutică. În dezvoltarea unor noi agenți terapeutici, testele in vitro pe modele celulare permit evaluarea compușilor prin răspunsuri biologice cuantificabile — modificări ale proliferării și ale viabilității celulare — oferind informații despre activitatea biologică și toxicitatea lor. Aceste investigații inițiale contribuie la selecția preliminară a candidaților care vor trece prin etapele ulterioare de testare.

Alegerea liniei celulare depinde de obiectivul studiului și de caracteristicile biologice ale liniei. Pentru evaluarea permeabilității intestinale este nevoie de un model care formează o barieră epitelială, iar pentru studiul metabolizării hepatice, de linii care exprimă enzimele implicate în biotransformarea medicamentelor.

O altă aplicație majoră este producția medicamentelor biologice: liniile celulare servesc fie ca substrat pentru obținerea vaccinurilor, fie ca sursă de proteine recombinante cu efect terapeutic (tabelul de mai jos).

Linia celulară	Aplicații în domeniul farmaceutic
CHO (celule ovariene de hamster chinezesc)	linia dominantă în producția proteinelor recombinante terapeutice; celulele modificate genetic produc majoritatea anticorpilor monoclonali
Vero (celule epiteliale renale de maimuță verde africană)	substrat celular pentru producția unor vaccinuri virale (de exemplu vaccinuri poliomielitice inactivate, vaccinuri antirabice)
HEK293F (derivată din linia HEK293, celule renale embrionare umane, adaptată la suspensie)	modificată genetic, este folosită la producția factorului VIII de coagulare uman recombinant (simoctocog alfa); linia HEK293 este utilizată și la producția vectorilor virali
Caco-2 (adenocarcinom colorectal uman)	după diferențiere formează un monostrat cu joncțiuni strânse — model pentru permeabilitatea intestinală a medicamentelor (transport pasiv și mediat de transportori, de exemplu glicoproteina P)
HepaRG (linie hepatică umană derivată dintr-un hepatocarcinom)	se diferențiază în celule de tip hepatocitar care exprimă enzimele citocromului P450 — studiul metabolizării și al hepatotoxicității medicamentelor

În producția biofarmaceutică, fiecare lot pornește dintr-o **bancă de celule** cu două niveluri: banca de celule master (MCB) și banca de celule de lucru (WCB), derivată din aceasta. Băncile se caracterizează și se testează conform ghidurilor ICH Q5D și Q5A — identitate, sterilitate, absența micoplasmelor (Ph. Eur. 2.6.7) și a virusurilor adventițiale — pentru ca fiecare lot de produs să provină din celule identice și sigure.

Surse frecvente de erori

- nerespectarea regulilor de lucru aseptic sau folosirea unor materiale nesterile, cu contaminări bacteriene sau fungice;
- contaminarea cu micoplasme — invizibilă la microscop, detectabilă numai prin teste specifice (PCR, cultură);
- decongelarea lentă, care prelungește expunerea celulelor la DMSO;
- îndepărtarea incompletă a mediului cu ser înainte de adăugarea tripsinei-EDTA, care inhibă detașarea;
- expunerea prelungită la tripsină-EDTA, care reduce capacitatea de reatașare și viabilitatea;
- erori de numărare (suspensie neomogenă, camera supraîncărcată, timp prea lung de expunere la albastru de tripan), cu densitate de însămânțare greșită;
- condiții de incubare necorespunzătoare (temperatură, concentrație de CO_2, umiditate);
- erori de calcul al concentrației și al volumului de DMSO din criovial;
- nerespectarea condiț□lor de depozitare (păstrarea □ndelungată la −80 °C, □ncălzirea criovialelor în timpul transportului);

– etichetarea greșită a flaskurilor sau a criovialelor și contaminarea încrucișată între linii; identitatea liniilor se verifică periodic prin profil STR.

Exemple rezolvate suplimentare

EXEMPLUL 1 — însămânțarea unei plăci de 96 de godeuri

Se dorește 8 000 celule/godeu în 100 µL, în cele 60 de godeuri interioare. Suspensia stoc are $1{,}0 \times 10^6$ celule viabile/mL.

concentrația necesară = 8 000 celule / 0,1 mL = $8{,}0 \times 10^4$ celule/mL

se prepară 7,0 mL (60 × 0,1 mL = 6,0 mL + exces pentru pipetare): $8{,}0 \times 10^4 \times 7{,}0 = 5{,}6 \times 10^5$ celule

V stoc = $5{,}6 \times 10^5 / 1{,}0 \times 10^6$ = 0,56 mL suspensie + 6,44 mL mediu

EXEMPLUL 2 — prepararea criovialelor

Se congelează 5 crioviale a câte 1 mL, cu 2×10^6 celule/mL, în mediu cu 10 % DMSO. Suspensia disponibilă: $2{,}5 \times 10^6$ celule viabile/mL.

celule necesare = $5 \times 2 \times 10^6 = 1{,}0 \times 10^7$; V suspensie = $1{,}0 \times 10^7 / 2{,}5 \times 10^6$ = 4,0 mL

după centrifugare, peletul se resuspendă în 5,0 mL mediu de congelare: 4,5 mL ser fetal bovin + 0,5 mL DMSO

Varianta cu adăugarea DMSO direct în criovial: pentru 1,0 mL final cu 5 % DMSO → 0,95 mL suspensie + 0,05 mL DMSO.

EXEMPLUL 3 — timpul de dublare și densitatea de însămânțare

Într-un flask de 25 cm^2 se însămânțează 5×10^5 celule; după 72 de ore se recoltează 4×10^6 celule.

$PD = \log_2 (4 \times 10^6 / 5 \times 10^5) = \log_2 8 = 3$; $t_d = 72\ h / 3 = 24\ h$

Pentru un flask de 75 cm^2 cu densitatea de însămânțare 1×10^4 celule/cm^2:

celule necesare = $75 \times 1 \times 10^4 = 7{,}5 \times 10^5$; din suspensia de $1{,}0 \times 10^6$ celule/mL se iau 0,75 mL

Întrebări

1. Prin ce se deosebesc culturile primare de liniile celulare finite și continue?
2. Care este rolul tripsinei și care este rolul EDTA în detașarea celulelor aderente?
3. De ce se subcultivă celulele la 70–80 % confluență și nu la confluență completă?
4. De ce congelarea se face lent, iar decongelarea rapid?
5. Ce este o bancă de celule master și de ce este necesară în producția biofarmaceutică?

Probleme propuse (răspunsuri în Anexa 3)

1. În cele 4 pătrate mari se numără 38, 42, 40 și 40 de celule viabile și, în total, 10 celule moarte (diluție 1 : 2 cu albastru de tripan). Calculați concentrația celulelor viabile și viabilitatea.
2. Se însămânțează o placă de 24 de godeuri cu 5×10^4 celule/godeu în 0,5 mL. Se prepară 13 mL suspensie dintr-un stoc cu $2{,}0 \times 10^6$ celule/mL. Ce volume de stoc și de mediu se folosesc?
3. Ce volum de DMSO trebuie adăugat pentru a obține 1,8 mL suspensie cu 10 % DMSO (v/v)?
4. O cultură crește de la 2×10^5 la $3{,}2 \times 10^6$ celule în 96 de ore. Calculați numărul de dublări și timpul de dublare.

Test de autoevaluare (un singur răspuns corect)

1. **Rolul EDTA în soluția de tripsină-EDTA este de a:**
   a) neutraliza tripsina
   b) chelata ionii Ca^{2+} și Mg^{2+} necesari adeziunii
   c) hrăni celulele
   d) menține pH-ul
2. **În testul cu albastru de tripan, celulele colorate în albastru sunt:**
   a) viabile
   b) moarte, cu membrana lezată
   c) în diviziune
   d) contaminate
3. **Viteza de răcire recomandată la crioconservare este de aproximativ:**
   a) −1 °C/min
   b) −10 °C/min
   c) −50 °C/min
   d) răcire instantanee în azot lichid
4. **Linia celulară cea mai folosită pentru producția anticorpilor monoclonali este:**
   a) Vero
   b) Caco-2
   c) CHO
   d) HepaRG

Anexa 1. Corespondența lucrărilor cu capitolele manualului

Nr.	Lucrarea practică	Capitol din manual
1	Formele farmaceutice: de la preparatele tradiționale la tehnologiile moderne	Cap. 1 — Industria farmaceutică: evoluție, organizare și perspective
2	Procesul de dezvoltare a medicamentului. Solubilitatea substanței active	Cap. 2 — De la descoperirea moleculei la substanța medicamentoasă
3	Materii prime în industria farmaceutică: umiditate, apă purificată, control de pH	Cap. 3 — Materii prime, reactivi și solvenți utilizați în industria farmaceutică
4	Operații unitare mecanice și termice: mărunțirea, cernerea, evaporarea	Cap. 4 — Procese fundamentale și operații unitare în industria farmaceutică
5	Operații unitare de difuziune și separare: dializa și filtrarea sub vid	Cap. 4 — Procese fundamentale și operații unitare în industria farmaceutică
6	Sinteza chimică a unei substanțe medicamentoase: acidul acetilsalicilic	Cap. 5 — Sinteza chimică industrială a substanțelor medicamentoase
7	Fermentația alcoolică cu Saccharomyces cerevisiae	Cap. 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice
8	Metabolismul aerob și anaerob al drojdiilor. Rolul oxigenului în fermentații	Cap. 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice (9.6. Transferul de oxigen)
9	Enzime proteolitice: hidroliza cazeinei cu papaină și tripsină	Cap. 7 — Introducere în biotehnologia farmaceutică
10	Biosinteza antibioticelor: activitatea antibacteriană a culturilor de Penicillium	Cap. 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice (9.10. Fermentația penicilinei)
11	Activitatea enzimatică a catalazei	Cap. 7 — Introducere în biotehnologia farmaceutică
12	Bacterii lactice și probiotice: cultivare și activitate fermentativă	Cap. 9 — Microorganisme și fermentații farmaceutice
13	Procesarea în aval: izolarea și purificarea parțială a proteinelor din lapte	Cap. 16 — Procesarea în aval
14	Buna practică de fabricație și producția aseptică: monitorizarea microbiologică a mediului și a operatorului	Cap. 17 — Buna practică de fabricație; cap. 18 — Producția aseptică
15	Tehnici de cultivare și conservare a culturilor celulare in vitro, cu aplicații în industria farmaceutică	Cap. 10 — Culturi celulare animale și vegetale; cap. 15 — Procesarea în amonte

Anexa 2. Relații de calcul și constante utile

Mărime	Relație
Cantitate de substanță	n (mol) = m (g) / M (g/mol)
Concentrație molară	c (mol/L) = n / V (L)
Concentrație procentuală	% (m/V) = g substanță / 100 mL soluție
Diluare	$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$
Randament	η (%) = m practică × 100 / m teoretică
Randament global	η global = $\eta_1 \times \eta_2 \times \ldots \times \eta$
Gaz la ≈ 25 °C, 1 atm	V molar ≈ 24,0–24,5 L/mol
Aciditate Thörner	°T = mL NaOH 0,1 M pentru 100 mL probă
Plăci de sedimentare	UFC/4 h = UFC × 4 / timp de expunere (h)

Substanță	Formulă	M (g/mol)
Acid acetilsalicilic	$C_9H_8O_4$	180,16
Acid salicilic	$C_7H_6O_3$	138,12
Anhidridă acetică	$C_4H_6O_3$	102,09
Acid citric monohidrat	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	210,14
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	151,16
Glucoză	$C_6H_{12}O_6$	180,16
Etanol	C_2H_5OH	46,07
Acid lactic	$C_3H_6O_3$	90,08
Carbonat de calciu	$CaCO_3$	100,09
Clorură de sodiu	NaCl	58,44
Sulfat de amoniu	$(NH_4)_2SO_4$	132,14

Anexa 3. Răspunsuri la problemele propuse și la testele de autoevaluare

Lucrarea 1

Problema 1. Limite ±7,5 %: 166,5–193,5 mg; ±15 %: 153–207 mg. Două comprimate în afara ±7,5 %, niciunul în afara ±15 % → conformă.

Problema 2. 1,19 % → neconform (> 1,0 %).

Problema 3. 171 mg; 85,5 %.

Problema 4. $\bar{x}$ = 3,60 min; s = 0,32 min; CV = 8,8 %.

Test: 1 – c; 2 – b; 3 – a; 4 – b

Lucrarea 2

Problema 1. D_0 = (400/250) / 0,021 = 76 → solubilitate redusă.

Problema 2. S = 0,021 × (1 + 10^2,4) = 5,3 mg/mL; D_0 = 0,30.

Problema 3. ≈ 40 mL pentru 1 g → „puțin solubil" (30–100 mL).

Problema 4. 21,6 mL.

Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 3

Problema 1. 10^0,19 = 1,55.

Problema 2. 8,10 %.

Problema 3. Conformă ca apă purificată (≤ 5,1 µS/cm); neconformă ca apă pentru preparate injectabile (limita ≈ 1,3 µS/cm la 25 °C).

Problema 4. 1,500 mmol × 3 = 4,500 mmol → 45,0 mL.

Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 4

Problema 1. Total 4,95 g; fracții 6,1 / 22,2 / 48,5 / 23,2 %; cumulat trecut: < 125 µm 23,2 %, < 250 µm 71,7 %, < 500 µm 93,9 %; d_{50} ≈ 194 µm.

Problema 2. Carr 8,3 %; Hausner 1,09 → excelentă.

Problema 3. 4 000 cm^2/g.

Problema 4. 93,0 %.

Test: 1 – b; 2 – c; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 5

Problema 1. 90 s (debitul este proporțional cu Δp).

Problema 2. N = ln 100 = 4,6 DV.

Problema 3. 93,9 %.

Problema 4. Trec glucoza și insulina; albumina și IgG sunt reținute.

Test: 1 – a; 2 – c; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 6

Problema 1. m teoretică = 4,57 g; randament 78,9 %.

Problema 2. Peste pragul de identificare (0,10 %) → trebuie identificată; sub pragul de calificare (0,15 %).

Problema 3. E = (11,95 − 3,20) / 3,20 = 2,73.

Problema 4. 29,0 mmol s 52,9 mmol → 1,82.

Test: 1 – b; 2 – b; 3 – c; 4 – b

Lucrarea 7

Problema 1. 27,8 mmol glucoză → 55,5 mmol CO_2 → 1,33 L.
Problema 2. μ = ln 16 / 8 = 0,347 h^{-1}; t d = 2,0 h.
Problema 3. 10,4 mmol → 0,480 g.
Problema 4. 9 g/L.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 8

Problema 1. RQ = 1,0 → respirație.
Problema 2. 19,8 mmol O_2/(L · h).
Problema 3. 7,9 g/L.
Problema 4. 300 mmol, respectiv 20 mmol.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – a

Lucrarea 9

Problema 1. [S] = 9 · Km = 18 mM.
Problema 2. 15 U în total → 3 U/mg.
Problema 3. 0,020 /min.
Problema 4. 60 %.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – a; 4 – c

Lucrarea 10

Problema 1. 9 mm.
Problema 2. 3,2 UI/mL.
Problema 3. 0,72 g.
Problema 4. 4,62 t.
Test: 1 – b; 2 – a; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 11

Problema 1. ≈ 6 %.
Problema 2. 2,65 mmol H_2O_2 → 1,32 mmol O_2 → 31,8 mL.
Problema 3. k = 0,0173 s^{-1}.
Problema 4. 35 %.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 12

Problema 1. 0,81 % → 8,1 g/L.
Problema 2. 8,7 × 10^7 UFC/g.
Problema 3. 1,12 log.
Problema 4. 8,0 mL.
Test: 1 – a; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 13

Problema 1. 242 g/L → 7,27 g.
Problema 2. 60,6 %.
Problema 3. 94,4 %.
Problema 4. 12,2 log.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – a; 4 – c

Lucrarea 14

Problema 1. 40 UFC/4 h → clasa C (≤ 50).
Problema 2. Depășește limita de acțiune (5 UFC) → investigație.
Problema 3. 3,85 log.
Problema 4. Depășește clasa C (100); compatibilă cu clasa D (≤ 200).
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – b; 4 – b

Lucrarea 15

Problema 1. $8{,}0 \times 10^5$ celule viabile/mL; viabilitate 94,1 %.
Problema 2. $1{,}0 \times 10^5$ celule/mL × 13 mL = $1{,}3 \times 10^6$ celule → 0,65 mL stoc + 12,35 mL mediu.
Problema 3. 0,18 mL DMSO + 1,62 mL suspensie.
Problema 4. PD = $\log_2 16 = 4$; t d = 24 h.
Test: 1 – b; 2 – b; 3 – a; 4 – c

Anexa 4. Reactivii utilizați și pericolele lor

Tabelul rezumă pericolele principale; înainte de lucru se consultă fișa cu date de securitate (FDS) a produsului efectiv utilizat, deoarece clasificarea depinde de concentrație și de furnizor.

Reactiv	Pericol principal (pictogramă GHS)	Precauții	Lucrarea
Acid sulfuric concentrat	coroziv (GHS05)	arsuri grave, reacție violentă cu apa; se diluează adăugând acidul în apă	6
Anhidridă acetică	coroziv, inflamabil, toxic prin inhalare (GHS02, GHS05, GHS06)	lacrimogenă; numai sub nișă	6
Hidroxid de sodiu (solid, soluții concentrate)	coroziv (GHS05)	soluțiile 0,1 M sunt iritante pentru ochi	3, 12
Acid acetic glacial / 10 %	coroziv, inflamabil (glacial)	iritant în soluție diluată	3, 13
Etanol 96 %	lichid foarte inflamabil (GHS02), iritant ocular	departe de flacără	2, 6, 13, 14
Propilenglicol	nepericulos	—	2
Peroxid de hidrogen 3 %	iritant ocular	soluțiile concentrate sunt oxidante și corozive	11
Clorură ferică 1 %	iritant; coroziv în concentrație mare	pătează	6
Azotat de argint 1 %	coroziv, periculos pentru mediu (GHS05, GHS09)	pătează pielea; se colectează separat	5
Soluție Lugol (iod–iodură)	iritant	pătează	5
Albastru de metilen	nociv prin înghițire	pătează	5
Clorură de calciu	iritant ocular	—	5
Carbonat de sodiu	iritant ocular	—	5
Sulfat de amoniu	nepericulos în condiții normale	—	13
Sulfat de cupru (reactiv biuret)	nociv, iritant, periculos pentru mediu (GHS07, GHS09)	deșeurile nu se aruncă la chiuvetă	13
Fenolftaleină	suspectă de efecte cancerigene (GHS08)	se folosește în soluții diluate, în cantități mici	3, 12
Papaină, tripsină (pulbere)	sensibilizant respirator (GHS08)	se evită formarea prafului	9

Reactiv	Pericol principal (pictogramă GHS)	Precauții	Lucrarea
Culturi microbiene (grupa 1 de risc)	agenți biologici	lucru aseptic; autoclavare înainte de eliminare	7, 8, 10, 12, 14, 15
Albastru de tripan 0,4 %	poate provoca cancer (GHS08)	mănuşi; se evită contactul şi formarea aerosolilor	15
Dimetilsulfoxid (DMSO)	neclasificat ca periculos; traversează uşor pielea	mănuşi; evită transportul transcutanat al altor substanţe	15
Azot lichid	gaz refrigerat (GHS04): arsuri criogenice, asfixie în spaţii închise	mănuşi criogenice, vizieră, încăperi ventilate	15

Anexa 5. Glosar de termeni

ALCOA+ — principiile integrității datelor: atribuibile, lizibile, contemporane, originale, exacte, complete, consecvente, durabile, disponibile

Biodisponibilitate — fracția din doza administrată care ajunge nemodificată în circulația sistemică și viteza cu care ajunge

Bioreactor — vas în care se desfășoară un proces biologic în condiții controlate (temperatură, pH, oxigen, agitare)

Calificare — demonstrarea documentată că un echipament sau o utilitate funcționează conform specificațiilor

Capacitate tampon — cantitatea de acid sau bază tare necesară pentru modificarea pH-ului unei soluții tampon cu o unitate

Captură — prima etapă de purificare, care izolează și concentrează produsul din mediul de fabricație

Clarificare — îndepărtarea celulelor și a particulelor dintr-un lichid de cultură

Confluență — procentul din suprafața de cultivare acoperit de celulele aderente

Controale în proces (IPC) — verificări efectuate în timpul fabricației pentru a menține procesul în limite

Cosolvent — solvent miscibil cu apa, adăugat pentru a crește solubilitatea unei substanțe

Crioconservare — păstrarea celulelor la temperaturi foarte joase (−80 °C, azot lichid), în prezența unui crioprotector

Dezagregare — fragmentarea unei forme farmaceutice solide în mediu lichid

Diafiltrare — schimbul de tampon al unei soluții prin ultrafiltrare cu adaos continuu de tampon nou

Dizolvare — trecerea substanței active din forma farmaceutică în soluție; se măsoară prin procentul dizolvat în timp

Economie atomică — fracția din masa reactanților care se regăsește teoretic în produsul dorit

Efect Crabtree — fermentația alcoolică în prezența oxigenului, la concentrații mari de glucoză

Factor E — masa deșeurilor raportată la masa produsului

Fed-batch — regim de cultivare cu alimentarea treptată a substratului, fără evacuarea mediului

Friabilitate — pierderea de masă a comprimatelor prin abraziune în tamburul de testare

GMP — buna practică de fabricație — ansamblul regulilor care asigură fabricarea constantă și controlată a medicamentelor

Impuritate — orice componentă a substanței active sau a produsului care nu este entitatea chimică dorită

kLa — coeficient volumetric de transfer al oxigenului din faza gazoasă în lichid

Km — constanta Michaelis — concentrația de substrat la care viteza reacției enzimatice este jumătate din Vmax

Limită de acțiune — valoare a cărei depășire impune investigație și măsuri corective

Limită de alertă — valoare stabilită pe date istorice, care semnalează o abatere de la condițiile normale

Linie celulară continuă — populație de celule cu capacitate nelimitată de proliferare in vitro

LRV — factor de reducere logaritmică a încărcăturii virale sau microbiene printr-o etapă de proces

Metabolit secundar — compus care nu este necesar creșterii organismului, format de obicei în faza staționară

Pasaj — o subcultivare; numărul pasajului arată de câte ori a fost subcultivată o linie celulară

Pierdere la uscare — scăderea masei unei probe prin uscare în condiții definite

Punct izoelectric (pI) — pH-ul la care sarcina netă a unei molecule amfotere este nulă

Punctul de bule — presiunea la care gazul trece prin porii cei mai mari ai unei membrane umectate; test de integritate

Randament global — produsul randamentelor tuturor etapelor unui proces

Recristalizare — purificarea unui solid prin dizolvare la cald și cristalizare la răcire

RQ — coeficient respirator — raportul dintre CO_2 format și O_2 consumat

Serie (lot) — cantitate de produs fabricată într-un ciclu, cu calitate omogenă

Simularea procesului aseptic — umplerea unui mediu de cultură în locul produsului, pentru validarea procesului aseptic

Strategie de control al contaminării (CCS) — document care descrie integrat toate măsurile de prevenire a contaminării unui produs steril

Suprafață specifică — aria suprafeței particulelor raportată la masa lor

UFC — unitate formatoare de colonii

Unitate enzimatică (U) — cantitatea de enzimă care transformă 1 µmol substrat pe minut

Validare — demonstrarea documentată că un proces produce constant un rezultat conform specificațiilor

Bibliografie selectivă

1. Drăghici G.A. Industria medicamentului şi biotehnologii farmaceutice. De la substanţa activă la producţia farmaceutică modernă. Timișoara: Editura „Victor Babeş"; 2026.

2. European Pharmacopoeia, 11th Edition. Strasbourg: Council of Europe, EDQM; 2023.

3. European Commission. EudraLex Volume 4 — EU Guidelines for Good Manufacturing Practice. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. Brussels; 2022.

4. ICH Q8(R2) Pharmaceutical Development; ICH Q9(R1) Quality Risk Management; ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Geneva: ICH.

5. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11:506–514.

6. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Fleming's penicillin producing strain is not Penicillium chrysogenum but P. rubens. IMA Fungus. 2011;2(1):87–95.

7. Walker GM, Stewart GG. Saccharomyces cerevisiae in the production of fermented beverages. Beverages. 2016;2(4):30.

8. Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 6th ed. Elsevier; 2021.

9. ICH Q3A(R2) Impurities in New Drug Substances; ICH Q3C(R9) Impurities: Guideline for Residual Solvents. Geneva: ICH.

10. ICH M9 Biopharmaceutics Classification System-based Biowaivers. Geneva: ICH; 2019.

11. Doran PM. Bioprocess Engineering Principles. 2nd ed. Academic Press; 2013.

12. Wingfield PT. Protein precipitation using ammonium sulfate. Curr Protoc Protein Sci. 2016;84:A.3F.1–A.3F.9.

13. Council of Europe. European Pharmacopoeia — Live biotherapeutic products for human use (monografia 3053).

14. Freshney RI, Capes-Davis A. Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 8th ed. Wiley-Blackwell; 2021.

15. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. Br J Cancer. 2014;111(6):1021–1046.

16. ICH Q5D Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. Geneva: ICH.