

Matheus da Costa Apolinário

**IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENCONTRADOS EM
SALAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS ASSOCIADOS À
MANUFATURA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO**

DEZEMBRO - 2022

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Prof.^a Renata Cristina Picão e coorientação do Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

d643i da Costa Apolinário, Matheus
Identificação dos microrganismos encontrados em salas limpas e ambientes controlados associados à manufatura de produtos farmacêuticos / Matheus da Costa Apolinário. -- Rio de Janeiro, 2022.
61 f.

Orientadora: Renata Cristina Picão.
Coorientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Controle de qualidade microbiológico. 2. Identificação microbiana. 3. Salas limpas. 4. MALDI TOF. 5. Indústria farmacêutica. I. Picão, Renata Cristina, orient. II. Longo Fracalanza, Sergio Eduardo, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Matheus da Costa Apolinário**

DRE: 119038613

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
 Prof. Marco Antônio Lemos Miguel
 Prof. Raquel Regina Bonelli
 Prof. Karla Rodrigues Miranda (Suplente)

Título da Monografia: **“Identificação dos microrganismos encontrados em salas limpas e ambientes controlados associados à manufatura de produtos farmacêuticos”**

Local: Sala virtual [https:// meet.google.com/bnr-rjgc-zkg](https://meet.google.com/bnr-rjgc-zkg)

Data e hora de início: **21 de dezembro de 2022 às 9:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 21 de .dezembro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza
<u>10</u>	Prof. Marco Antônio Lemos Miguel
<u>10</u>	Prof. Raquel Regina Bonelli
<u> </u>	Prof. Karla Rodrigues Miranda


Presidente da banca



Sergio E. L. Fracalanza

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno:



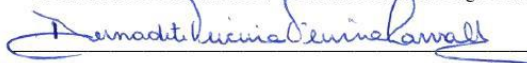
Matheus da Costa Apolinário

Orientador:



Profa. Renata Cristina Picão / Coorientador: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

À G. P., que, com o sábio uso das palavras, entregou através do tempo uma das mais gratificantes e reveladoras mensagens que eu poderia receber. Acredito que “o português” tenha ficado muito agradecido pela lembrança.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Júlio e Roseli, e à minha irmã mais velha, Juliana, por sempre estarem presentes e demonstrarem apoio em minhas decisões mais importantes nos meus vinte e três anos de existência. Sou imensamente grato por todo o amor, educação, paciência e dedicação investidos na minha formação como ser humano.

Agradeço à professora Renata, minha orientadora, a qual esteve presente desde o início da minha graduação e me recebeu de braços abertos em seu laboratório. Muito obrigado pelos ensinamentos, direcionamento, apoio acadêmico, e principalmente por ter aceitado orientar o aluno que só sabia pensar em bacteriófagos. Agradeço igualmente aos meus coorientadores ao longo do curso: o Roberto, por ter me instruído com seu vasto conhecimento, sempre acompanhado de um humor e personalidade contagiantes; e o professor Sergio, por ter abraçado a causa e me auxiliado nessa última jornada com seus aconselhamentos e sua grande sabedoria.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por oferecer um ambiente próspero e rico em conhecimentos para o desenvolvimento e formação de profissionais atuantes nas grandes áreas da microbiologia e imunologia.

Aos integrantes do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, dentre eles professores, doutorandos, mestrandos, técnicos e alunos de IC, que estiveram presentes e me ampararam no meu primeiro contato com um laboratório de microbiologia na posição de aprendiz.

À direção, gestão e aos colaboradores da indústria onde atuei como estagiário, Julia, Jeniffer, Jeanine, Max e Carlos, não só por possibilitarem a realização deste projeto, mas também por terem me acolhido, treinado e compartilhado um pouco de si, tornando toda a experiência mais interessante.

Aos meus amigos da graduação, Vinicius, Pedro, Stefanie, Renan, Athirson, Isabela, Eduardo e Ralice, pelos momentos especiais e inesquecíveis vivenciados durante quatro anos na UFRJ. A faculdade teria sido mais árdua se não fosse por vocês.

Aos professores da banca avaliadora deste trabalho de conclusão de curso, por terem aceitado o convite de participação e pela contribuição ao trabalho desenvolvido.

E por fim, mas não menos importante, ao Darwin, meu querido amigo caramelo de quatro patas, pelas inúmeras vezes em que pediu carinho enquanto eu escrevia o TCC. É sempre bom dar uma pausa para respirar.

“Na investigação biológica, grande pesquisador não é na realidade aquele que de um simples fato, com estrita lógica, prevê as suas últimas consequências, mas ao contrário aquele que não se deixa cegar por ela e atiladamente surpreende a significação dos fatos submetidos à lógica aparentemente incompreensível dos fenômenos naturais.”

Dr. José da Costa Cruz

RESUMO

MATHEUS DA COSTA APOLINÁRIO

IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ENCONTRADOS EM SALAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS ASSOCIADOS À MANUFATURA DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Orientadora: Renata Cristina Picão

Coorientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os elementos com potencial de gerar irregularidades no decorrer do processo de fabricação de medicamentos podem ser de diferentes naturezas: química, física ou microbiológica. O setor de controle de qualidade é o segmento industrial responsável pela verificação da conformidade com os padrões pré-determinados e sinalização de ações preventivas ou corretivas, visando a concordância dos parâmetros do produto com os padrões exigidos pelos órgãos reguladores para a garantia da segurança do consumidor. Uma vez que os microrganismos habitam os mais variados ambientes e se difundem amplamente pelas superfícies, em especial aderidos a partículas, são considerados importantes contaminantes de produtos farmacêuticos em virtude do risco que representam à integridade do fármaco e ao bem-estar do público-alvo. A identificação dos microrganismos contaminantes se faz fundamental para o controle de qualidade, pois possibilita evidenciar possíveis fontes de contaminação e melhorias de processos. O objetivo deste trabalho foi identificar os microrganismos isolados durante o programa de monitoramento ambiental de sete áreas de uma indústria farmacêutica (áreas classificadas em graus A, C e D, e ambientes controlados associados). Os locais foram submetidos a amostragem por meio da sedimentação e ar ativo, utilizando-se como meio de cultura o Ágar Triptona de Soja (TSA) incubado a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 48h, e $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por mais 72h. As unidades formadoras de colônias foram contabilizadas e identificadas por espectrometria de massas pelo MALDI-TOF, com exceção dos fungos filamentosos. Do total de 956 colônias submetidas à identificação, obteve-se 697 análises válidas (73,0%) com, no mínimo, provável identificação de gênero, das quais 532 (76,0% das válidas) pertenceram ao grupo dos cocos gram-positivos. As espécies com maior frequência do total de identificações foram: *Micrococcus luteus* (32,9%), *Staphylococcus haemolyticus* (10,3%) e *Staphylococcus saprophyticus* (9,0%). Dos grupos identificados em menor número, 130 bacilos gram-positivos e 35 bacilos gram-negativos, as espécies mais frequentes foram *Brevibacterium casei* (7,7%) e *Pseudomonas stutzeri* (25,7%), respectivamente. As espécies isoladas em maior número foram amplamente associadas à microbiota da pele humana, o que levanta a hipótese de o fluxo de operadores nas áreas ser a maior fonte de contaminação. A implementação do programa de monitoramento ambiental se faz de extrema importância para garantir as Boas Práticas de Fabricação, as normas de vigilância sanitária de limite microbiológico e continuidade operacional da indústria no mercado.

Palavras-chave: Controle de qualidade microbiológico; identificação microbiana; salas limpas; MALDI-TOF; indústria farmacêutica.

ABSTRACT**MATHEUS DA COSTA APOLINÁRIO****IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS FOUND IN CLEAN ROOMS AND CONTROLLED ENVIRONMENTS ASSOCIATED WITH THE MANUFACTURE OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS****Orientadora: Renata Cristina Picão
Coorientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The elements with the potential to generate irregularities during the drug manufacturing process can be of different natures: chemical, physical or microbiological. The quality control sector is the industrial segment responsible for verifying compliance with predetermined standards and indicating preventive or corrective actions, aiming at the agreement of product parameters with the standards required by regulatory agencies to ensure consumer safety. Once microorganisms can inhabit the most varied environments and spread widely across surfaces, especially adhered to particles, they are considered important contaminants of pharmaceutical products due to the risk they represent to the integrity of the drug and the well-being of the target audience. The identification of contaminant microorganisms is fundamental for quality control, as it allows to evidence possible sources of contamination and process improvements. The objective of this work was to identify microorganisms isolated during the environmental monitoring program of seven areas of a pharmaceutical industry (areas classified in grades A, C and D, and associated controlled environments). The sites were submitted to sampling by sedimentation and active air, using Trypticase Soy Agar (TSA) as culture medium and incubated at $32.5\text{ °C} \pm 2.5\text{ °C}$ for 48h, and $22.5\text{ °C} \pm 2.5\text{ °C}$ for 72h. The colony-forming units were quantified for and identified by mass spectrometry by MALDI-TOF, with the exception of filamentous fungi. Of the total of 956 colonies submitted to identification, 697 valid analyses (73.0%) were obtained with at least probable gender identification, of which 532 (76.0% of valid ones) belonged to the gram-positive coconut group. The species with the highest frequency of total identifications were: *Micrococcus luteus* (32.9%), *Staphylococcus haemolyticus* (10.3%) and *Staphylococcus saprophyticus* (9.0%). Of the groups identified in smaller numbers, 130 gram-positive bacilli and 35 gram-negative bacilli, the most common species were *Brevibacterium casei* (7.7%) and *Pseudomonas stutzeri* (25.7%), respectively. The species isolated in greater numbers were widely associated with microbiota of human skin, which raises the hypothesis that the flow of operators in the areas is the main source of contamination. The implementation of the environmental monitoring program is extremely important to ensure good manufacturing practices, microbiological limit health surveillance standards and industry operational continuity in the market.

Keywords: Microbiological quality control; microbial identification; cleanrooms; MALDI-TOF; pharmaceutical industry.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

MATHEUS DA COSTA APOLINÁRIO

O EMPREGO DE MÉTODOS RÁPIDOS NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO AR DE ÁREAS PRODUTIVAS FARMACÊUTICAS

Orientadora: Renata Cristina Picão

Coorientador: Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Um estudo realizado em um laboratório universitário do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em parceria técnico-científica com uma indústria farmacêutica nacional, revelou que os microrganismos da pele humana são encontrados no ar de salas limpas e ambientes controlados associados à manufatura de produtos farmacêuticos. A pesquisa conduzida nos meses de maio e junho de 2022 teve como objeto de estudo os microrganismos isolados através da captação rotineira do ar de sete salas limpas, e a identificação foi feita através de uma das tecnologias de métodos rápidos mais modernas disponíveis no mercado, denominada de MALDI-TOF MF (*Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*). Do total de 956 amostras analisadas, 697 (73,0%) foram cocos gram-positivos, sendo *Micrococcus luteus* (32,9%), *Staphylococcus haemolyticus* (10,3%) e *Staphylococcus saprophyticus* (9,0%) as espécies mais frequentemente encontradas. Outros grupos bacterianos revelados em menor quantidade corresponderam à bacilos gram-positivos (130, 18,6%), e bacilos gram-negativos (35, 5,0%). Dentre esses, destacaram-se *Brevibacterium casei* (7,7%) e *Pseudomonas stutzeri* (25,7%). O perfil microbiano detectado está de acordo com estudos similares acerca da microbiota existente nesses espaços, sendo os gêneros *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. os mais comuns em virtude da associação das principais espécies à pele do ser humano. Esses dados podem sugerir que os operadores das áreas foram a via majoritária de difusão microbiana. Gêneros como *Pseudomonas* spp., *Brevibacterium* spp. e *Bacillus* spp., também encontrados neste estudo, são oriundos da sua ampla distribuição no ambiente. A cooperação estabelecida entre os laboratórios possibilitou o levantamento de dados microbiológicos que auxiliam nas ações de vigilância do setor de controle de qualidade da indústria farmacêutica, em especial nas atividades relacionadas ao programa de monitoramento ambiental das áreas classificadas.

Palavras-chave: Controle de qualidade microbiológico; identificação microbiana; salas limpas; MALDI-TOF; indústria farmacêutica.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A qualidade na indústria	1
1.1.1 Os órgãos reguladores	1
1.2 O sistema de qualidade farmacêutica	4
1.2.1 Gerenciamento de Riscos de Qualidade (GRQ)	5
1.2.2 Boas Práticas de Fabricação (BPF)	6
1.3 O controle de qualidade na indústria.....	7
1.4 O controle de qualidade microbiológico na indústria	9
1.4.1 As salas limpas e classificação	10
1.4.2 O monitoramento ambiental microbiológico	13
1.4.3 Metodologias e equipamentos de amostragem	15
1.5 Identificação de microrganismos	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Desenho do estudo	21
4.2 Processamento das placas de amostragem	22
4.3 Seleção e repique das culturas isoladas	23
4.4 Identificação pelo MALDI-TOF.....	24
5 RESULTADOS	26
5.1 Quantificação microbiana a partir do monitoramento ambiental	26
5.2 Identificação dos microrganismos	27
5.3 Estratificação em grupos bacterianos.....	28
5.4 Espécies bacterianas identificadas	31
5.4.1 Grupo dos cocos gram-positivos (CGP).....	31
5.4.2 Grupo dos bacilos gram-positivos (BGP).....	35
5.4.3 Grupo dos bacilos gram-negativos (BGN)	39
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 A QUALIDADE NA INDÚSTRIA

No decorrer dos anos, a manutenção e progresso de uma empresa no mercado passaram a se encontrar cada vez mais interligados à satisfação do consumidor, a qual é conquistada através de uma dedicada atenção e anseio pela implantação do fator *qualidade*. Um consumidor satisfeito com um determinado produto tem o potencial de se tornar porta-voz de divulgação do mesmo e conferir valiosa visibilidade. Em virtude disso, novos consumidores são conquistados, há geração de maior lucro e contribuição para o crescimento exponencial da empresa (Barbosa, Trigo e Santana, 2015). De acordo com Joseph M. Juran, responsável pelo estabelecimento de conceitos básicos de qualidade até hoje considerados, a qualidade é a ausência de defeitos e, para que esse fator seja sustentado, é imprescindível que haja motivação e plena realização das atividades por parte dos colaboradores de uma organização (Juran, 1989 *apud* Silva *et al.*, 2018). Em outras palavras, as expectativas e necessidades do consumidor serão atendidas por meio do desempenho adequado das funções pelas pessoas envolvidas em todas as etapas pertinentes à produção de um dado produto.

Segundo Crosby (1979), a qualidade pode ser definida como “conformidade às especificações”, ou seja, entregar ao consumidor aquilo que é prometido. Este empresário estadunidense também afirma que a qualidade é gratuita e o que gera custos extras relaciona-se com a desqualificação, ou com a realização do trabalho de forma inadequada. Nesse sentido, a partir do momento em que algum elemento ou colaborador atuante na cadeia de produção não age conforme a sua função e não há a detecção ou remediação dessa falha, haverá o não cumprimento das especificações e a não correspondência às expectativas do consumidor. Esses fatos podem acarretar o processo de recolhimento do produto comercializado, gerando perdas econômicas significativas e ainda pôr sob risco a reputação da empresa no mercado (Brasil, 2022). Assim sendo, a organização que não se empenha em manter uma vigilância rigorosa e constante quanto à qualidade na manufatura está fadada a gerar produtos que resultam no descontentamento de quem os compra. À vista disso, é fundamental que todos os setores componentes de uma empresa cumpram com o papel determinado visando garantir a adequação aos padrões de qualidade implementados.

1.1.1 OS ÓRGÃOS REGULADORES

Historicamente o controle da qualidade na indústria foi desempenhado inicialmente a partir de amostragens e inspeções de produtos acabados. Tal estratégia apresentava diversos aspectos negativos e ineficazes, dentre os quais a perda de quantidade significativa de

produtos por apresentarem falhas e discordâncias quanto ao padrão desejado; além de haver a cultura de ocultar as imperfeições ao invés de procurar prevenir ou remediá-las (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015). Os planos de amostragem em diferentes níveis de fabricação só vieram a ser implementados durante a Segunda Guerra Mundial, quando houve a necessidade de um controle mais exigente no fornecimento do armamento para o exército americano, o que logo se mostrou aplicável e se propagou posteriormente para a indústria farmacêutica.

Com o desenvolvimento das tecnologias industriais, aprimoramento da manufatura e do advento de consumidores cada vez mais exigentes quanto ao aspecto da qualidade dos produtos comercializados, surgiu a necessidade da implementação de padrões de qualidade abrangentes. Nesse sentido, dentre as várias autoridades internacionais de padronização, emergiu, em 1947, a *International Organization for Standardization* (ISO) (Pereira, 2011).

No que se refere ao processo de desenvolvimento e implantação de padronizações internacionais, com aplicação industrial, a ISO procurou propor ao longo do tempo regulamentos plenamente consolidados que resultassem em um maior índice de eficiência na cadeia produtiva e correspondência com padrões especificados para cada produto e serviço. Esse direcionamento fez com que a ISO passasse a atuar como um agente facilitador mundialmente, aproximando fornecedores, produtores e consumidores (Cubas *et al.*, 2010). Assim, quando uma empresa ou organização enquadrava-se em normas de padronização definidas pela ISO, era possível ter o conhecimento prévio sobre as condições de atuação de um dado setor sem a necessidade de um contato direto, apenas reconhecendo o selo ao qual ela foi classificada, o que se manteve até a atualidade.

Diversas são as metodologias que se desenvolveram para a implementação de normas técnicas, seja em âmbito nacional ou internacional. Muitas empresas estabeleceram seus padrões industriais baseando-se em domínio de mercado, com atuação independente e direcionada para seus interesses, mas a ISO seguiu uma linha alternativa, optando por meio de comitês técnicos compostos por especialistas, o desenvolvimento de novos e abrangentes itens de padronização, contemplando de forma consensual os requerimentos e as adversidades encontradas pelos diferentes setores abrangidos; o industrial, o empresarial e o acadêmico (Heires, 2008).

Embora a ISO seja uma empresa privada, suas normas de padronização, na prática, se tornam obrigatórias, em virtude de vários aspectos considerados positivos para o desempenho da indústria que as diretrizes estabelecidas conferem. Isso faz com que toda a rede produtiva das grandes corporações internacionais passe a exigir de outras empresas associadas e fornecedores as qualificações certificadas pela ISO. Ademais, a organização internacional em

padronizações estabeleceu uma mudança significativa no mercado, partindo de padronizações de produtos para padronizações de processos, idealizando as normas de gestão de qualidade da série 9000. Uma padronização dessa natureza fornece um padrão de referência na qual uma empresa pode desenvolver todo o seu programa de garantia de qualidade de forma confiável e adaptada ao produto que se visa produzir e comercializar (Cater e Pasqualone, 1993).

No que diz respeito à indústria farmacêutica, os alicerces que a sustentam e exercem grande influência na atualidade começaram a tomar forma a partir da década de 1960, através de dois movimentos de grande relevância. O primeiro a surgir ficou conhecido mundialmente por Boas Práticas de Fabricação (BPF), *Good Manufacturing Practices* (GMP), um programa de controle de qualidade que apresenta como propósito assegurar não somente a eficácia, mas também a segurança e confiabilidade do processo de manufatura. Já o segundo movimento surgiu em decorrência da filosofia japonesa da busca pela qualidade almejando o “defeito zero”, através da mudança comportamental que levaria à otimização da produtividade, introduzindo 5 principais condutas, o chamado “Programa 5 S”: *seiri* (organização), *seiton* (arrumação), *seisô* (limpeza), *seiketsu* (asseio) e *shitsuke* (disciplina) (Rocha e Galende 2014; Bretaudeau *et al.*, 2020).

Ao final da década de 1970, uma outra definição importante para a indústria foi introduzida, intitulada de Garantia de Qualidade (GQ), *Quality Assurance* (QA). Esse novo conceito trouxe uma abordagem de caráter mais abrangente acerca do fator qualidade, ou seja, todos os aspectos qualitativos e quantitativos de um produto em conformidade com o especificado pelo seu produtor só serão alcançados através do empenho e da determinação, tanto coletiva quanto individual (Araújo *et al.*, 2008).

Ainda, no Brasil, desde o início da década de 1980, agências regulatórias elaboram normas que estabelecem parâmetros a serem atendidos no âmbito da produção de medicamentos no país seja realizada de forma adequada. A legislação sanitária brasileira, através da Portaria nº14 de 1981 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, estabeleceu o que seria a primeira das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM) brasileiras, num documento que determinava também, a prática de inspeções para avaliar a concordância com as BPFM (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

Posteriormente, no final da década de 1990, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi estabelecida, associada ao Ministério da Saúde, com o objetivo de promover saúde pública por meio da aplicação de normas de vigilância, e com a realização de inspeções e processos avaliativos sobre produtos e serviços que eventualmente poderiam oferecer algum risco à saúde (Huynh-ba e Sassi, 2018).

1.2 O SISTEMA DE QUALIDADE FARMACÊUTICA

Segundo as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, previstas na Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC Nº 658, de 30 de março de 2022, *“para aquele que foi concedida a autorização de atuação no ramo industrial farmacêutico, fabricação e comercialização de medicamentos, é imprescindível fazê-lo de forma a garantir que o produto corresponda à função e finalidade para os quais foi desenvolvido, e não ofereça riscos adicionais à saúde (Brasil, 2022). Satisfazendo juntamente os requisitos de registro, ou permissão para uso em ensaios clínicos, o cumprimento do dever supracitado apresenta como principal utilidade garantir não só a integridade do fármaco, mas também a segurança do consumidor final”*.

Nesse sentido, é imperioso que o sistema de qualidade farmacêutica tenha o comprometimento de todos, desde a administração superior até a colaboração dos funcionários e de todos os departamentos existentes, albergando fornecedores e distribuidores. Além disso, deve-se certificar de que esse sistema tenha sido implementado de forma eficaz, se encontre operante dispondo de recursos essenciais, e que apresente as determinadas funções e autoridades de forma clara e acessível para toda a organização (Eudralex, 2013).

Em virtude de sua relevância, as atribuições acerca do estabelecimento de um sistema de qualidade ideal encontram-se difundidas pelas normas dos mais diversos órgãos regulatórios, em âmbito nacional e internacional, como o guia de Sistema de Qualidade Farmacêutica Q10, desenvolvido pelo *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, por exemplo, que se fundamenta nos principais conceitos de qualidade padrão ISO e nas Boas Práticas de Fabricação, já previstas em exigências regionais. Este documento pode ser implementado em todo o ciclo de vida útil do produto, integrando e estreitando relações entre os setores de pesquisa e desenvolvimento e de produção (ICH, 2008). O desenvolvimento ou melhoria do sistema de qualidade farmacêutica deve levar em consideração, segundo as diretrizes nacionais (RDC Nº 658), as limitações e a complexidade das atividades exercidas por uma determinada indústria farmacêutica, abrangendo uma série de fundamentos que devem ser seguidos. A implementação desses fundamentos procura assegurar que o produto seja fabricado de forma consistente, íntegra e respeitando os padrões de qualidade pré-determinados, por meio do planejamento, implementação de medidas e aprimoramento regular do sistema de fabricação (Brasil, 2022). Para que essa seja a realidade, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) devem ser respeitadas e adotadas de forma integral, no que diz

respeito ao desenvolvimento de medicamentos, concepção, e detalhamento das operações de produção e controle de qualidade.

A norma ABNT NBR ISO 9001, aborda as orientações e requisitos para o desenvolvimento pleno de um sistema de gestão de qualidade e alguns benefícios podem ser obtidos ao adotar-se decisões de cunho estratégico, no que diz respeito à estruturação industrial. Esse documento fornece uma referência fundamentada no ciclo *Plan-Do-Check-Act* (PDCA) e na mentalidade de risco. O PDCA tem como premissa a possibilidade de habilitar uma determinada organização para o melhor gerenciamento de seus recursos, oferecendo a capacidade de identificar decisões que resultam no aprimoramento de processos. Analisando-o de forma mais aprofundada, *“esse ciclo envolve o ato de planejar, onde os objetivos, recursos e requisitos serão determinados; realizar o que foi idealizado; fiscalizar se os resultados obtidos estão em conformidade; e agir, promovendo ações de aprimoramento de acordo com a demanda. A mentalidade de risco, por sua vez, manifesta-se nas situações de desvio de conformidade, sejam elas reais ou potenciais, com implementação de ações corretivas ou preventivas, respectivamente. Em suma, para que um sistema de qualidade íntegro seja construído é necessário incorporar em sua essência dois fatores de grande importância, o Gerenciamento de Riscos de Qualidade e as Boas Práticas de Fabricação”* (ABNT, 2015).

1.2.1 GERENCIAMENTO DE RISCOS DE QUALIDADE (GRQ)

O Gerenciamento de Riscos de Qualidade, ou *Quality Risk Management* (QRM), apresenta como objetivo primordial proteger o consumidor final de qualquer possível risco que o produto comercializado possa oferecer. Como são muitos os fatores que podem contribuir para uma irregularidade em medicamentos, deve ser assumido que o risco ao paciente pode não ser evitado por completo. Em relação às drogas, alguns dos principais riscos podem envolver a solubilidade, estabilidade e presença residual de solventes. Assim, é necessário o desenvolvimento e implementação de estratégias de redução de riscos para fins de diminuir a probabilidade de maiores complicações e estabelecer os riscos existentes em uma faixa segura de aceitabilidade, não representando uma ameaça mais grave (ICH, 2005).

Nesse sentido, segundo Charoo e Ali (2013): *“o GRQ desenvolve-se na indústria por meio de uma abordagem de caráter metódico, constituída por diferentes etapas essenciais, as quais envolvem o processo de avaliação sistemática do risco, permitindo a sua identificação, análise e estimativa; seguida das etapas de controle de risco, trabalhando com as possibilidades de redução e aceitabilidade; o que leva à produção, discussão e revisão de*

resultados, gerando um modelo melhor consolidado das estratégias de gerenciamento dos riscos envolvidos. É importante ressaltar que durante toda a etapa de estudo e avaliação, a utilização das ferramentas de gerenciamento de riscos (HACCP - Hazard Analysis and Critical Control Point, por exemplo) se faz fundamental, uma vez que possibilita um processo contínuo de aprimoramento das estratégias de controle”.

Um projeto de Gerenciamento de Riscos eficiente e robusto necessita da utilização de forma adequada das ferramentas de comunicação entre os principais representantes dos processos de fabricação, por exemplo, através do estabelecimento de contratos, apresentações, reuniões, e-mails e relatórios, além da formação de equipes de GRQ bem diversificadas, agregando profissionais de diferentes setores, como controle e garantia da qualidade, pesquisa e desenvolvimento (P&D), produção, assuntos regulatórios, e entre outros (Belart, 2009).

1.2.2 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF)

As Boas Práticas de Fabricação configuram-se como as principais diretrizes a serem seguidas quando há o intuito de se produzir e comercializar um determinado produto do segmento farmacêutico. Manifestando-se na forma de documentação, as BPF são submetidas a um processo de elaboração e revisão através de um esforço conjunto, de uma colaboração de extrema importância entre as indústrias farmacêuticas, os órgãos reguladores e diversas outras organizações ou instituições internacionais em posição de destaque. Desta forma, este documento é idealizado para fins de se assegurar que a geração de produtos desta categoria siga de forma consistente e controlada, apresentando o maior teor de eficácia e segurança, dentro das limitações existentes e sempre a favor dos padrões de qualidade (Gouveia *et al.*, 2015). Exercendo uma influência direta nas etapas de produção, distribuição e suprimento de artigos farmacêuticos, as orientações expressas pelas BPF são igualmente definidas como um dos fundamentos essenciais da Garantia de Qualidade, apresentando uma gama de requisitos imprescindíveis para o seu cumprimento adequado. Dentre eles, destaca-se que todos os processos de fabricação necessitam ser implementados e definidos de forma clara e acessível, sendo submetidos por revisões sistemáticas por parte de colaboradores experientes, e acima de tudo, que seja viável a produção de medicamentos dentro dos padrões de qualidade desejados e conformidade com as especificações. No que diz respeito às metodologias dos processos de fabricação, englobando possíveis alterações que venham a ser implementadas, deve-se promover a validação para fins de se comprovar a viabilidade de aplicação para a função pretendida (PIC/S, 2014).

Ademais, encontram-se diversas outras instruções de igual relevância, como as pertinentes às etapas de produção, mais especificamente, onde frisa-se que é fundamental que ela seja exercida e supervisionada por pessoal qualificado, e que registros sejam realizados de forma rigorosa, manual ou digitalmente, com as instruções e informações adequadamente descritas. Qualquer desvio ou não conformidade detectado deve ser reportado, comunicado aos responsáveis pela supervisão para que um processo investigativo seja iniciado, determinando o agente causador e possibilitando a implementação de soluções cabíveis. Tal processo também se demonstra aplicável nas ocasiões de produtos não satisfatórios circulantes no mercado, notificados pelo consumidor ou órgãos de vigilância (Eudralex, 2014).

1.3 O CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA

Seguindo uma linha de raciocínio semelhante às definições que permeiam o fator *qualidade* como anteriormente descrito, o *controle de qualidade* apresenta da mesma maneira um conceito de caráter amplo e generalista, o qual o estabelece como um sistema desenvolvido com a responsabilidade de manter as condições em um nível desejado de qualidade. Tal função, no que lhe diz respeito, deve ser exercida baseando-se em *feedbacks* acerca de características chave de produtos e/ou serviços, e na realização de ações corretivas, com o objetivo de remediar todo e qualquer desvio de conformidade que entre em desacordo com as especificações predeterminadas (Mitra, 2016).

Tratando-se das responsabilidades do produtor, independentemente ao setor industrial em que atua, é necessário que fundamente um sistema de checagem de excelência de processos e geração de produtos de forma bem detalhada, controlando não só os aspectos relacionados à produção, mas também avaliação e distribuição de mercadoria. Nesse sentido, o controle de qualidade manifesta-se na indústria como um segmento fortemente consolidado, um setor especializado em executar as atividades de verificação da conformidade aos padrões de qualidade requeridos para os produtos (Levi, Walker e Pugsley, 1964) (Figura 1). Em outras palavras, a credibilidade da empresa e a confiança passada aos consumidores são sustentadas através do conjunto de procedimentos ou operações, sejam eles de cunho programático, de logística ou executivo, que viabilizam esse processo de conferência de adequação ao desejado, através de determinadas análises, medições e registros (Rocha e Galende, 2014).

Apesar de poder ser considerado uma das etapas de maior importância dentro do processo de fabricação de produtos farmacêuticos, o setor de controle de qualidade não

desenvolve suas atividades de forma isolada, mas sim de forma conjunta a outros setores da organização, contribuindo para a identificação e sinalização de melhorias quanto ao processo de fabricação. Tais melhorias podem ser exemplificadas, como a redução de tempo em determinadas etapas, redução no consumo de insumos, padronização de procedimentos, condição de qualidade do ambiente de trabalho, realização de processos investigativos e implementação de ações corretivas e/ou preventivas. Além disso, a linha de produção de um determinado produto na indústria farmacêutica é um processo extremamente delicado e meticuloso, e é diretamente dependente da participação de uma gama de profissionais e equipamentos que devem atuar de forma a manter as condições de fabricação em níveis satisfatórios, não dando abertura para que as variáveis envolvidas induzam ao desvio de qualidade (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

O processo de fabricação de cada lote de um produto farmacêutico é constituído por diferentes etapas, e cada etapa, por sua vez, exige a realização de diferentes ensaios que viabilizam confirmar se os parâmetros de qualidade estão de acordo com a faixa desejada. Nesse sentido, baseando-se em cada fase da linha de produção, esses ensaios buscam verificar o *status* de determinados atributos, como a pureza físico-química e condição microbiológica, por exemplo, evitando produzir um fármaco fora das especificações necessárias e dos limites impostos pela vigilância sanitária, com base na farmacopeia vigente e em normas sanitárias de tolerância microbiológica (Aiache, Aiache e Renoux, 1998 *apud* Rocha e Galende, 2014).

É de responsabilidade do setor de controle de qualidade coletar amostras de cada lote fabricado, realizar testes adequados comparando os resultados com as especificações de cada produto, e formular certificados de análise e laudos analíticos para liberação de produtos, caso estejam em conformidade para comercialização, e não liberação de produtos com desvio de qualidade. São atribuições também do Controle de Qualidade, a elaboração, aprimoramento e colocação em prática de metodologias de análise e operações de laboratório devidamente fundamentadas, assim como realizar estudos de validação e auditoria interna, monitorar equipamentos utilizados, registrar e documentar todos os elementos e atividades relacionadas às suas funções para fins de controle e rastreabilidade (Brasil, 2022).

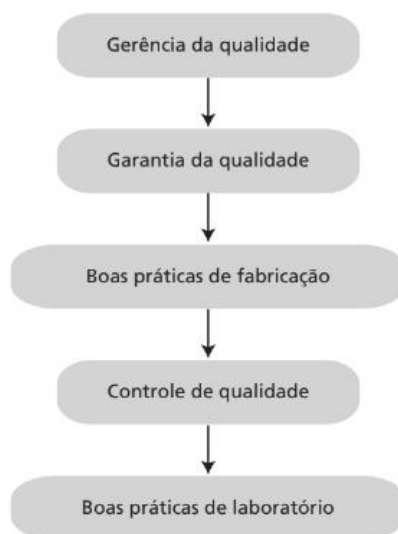


Figura 1 – Representação ilustrativa simplificada de um sistema de qualidade.
Fonte: Pinto, Kaneko e Pinto, 2015.

1.4 O CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA

Ao longo dos anos de desenvolvimento das ciências biológicas, em concomitância com o avanço tecnológico, a humanidade não mediu esforços em expandir cada vez mais os conhecimentos no âmbito da microbiologia e procurar compreender melhor como a vida se manifestava na esfera invisível ao olho nu. Nesse sentido, geraram-se novos ramos na ciência, dentre os quais atualmente encontra-se a Microbiologia Farmacêutica. De modo geral, a microbiologia voltada para os interesses e aplicações farmacêuticas se fundamenta em dois grandes pilares; o primeiro, diz respeito à aplicação de microrganismos que auxiliam na descoberta de novos fármacos, e o segundo, por sua vez, empenha-se em controlar a sua presença tanto em ambientes de produção quanto nos produtos fabricados (Sandle, 2016).

Na contemporaneidade é amplamente sabido que a geração de produtos de caráter alimentício, cosmético e farmacêutico, dentre outros, está sujeita à contaminação por microrganismos nos diferentes estágios pertinentes à manufatura. Essa contaminação, como consequência, pode ocasionar a rejeição do produto, ou até mesmo em casos mais graves, em efeitos adversos à saúde e até mesmo a morte do consumidor (Denyer e Baird, 2006).

A produção de um determinado produto farmacêutico, seja qual for a sua especificação, requer que o risco de contaminação microbiana seja considerado e controlado. Nesse sentido, metodologias de controle microbiológico têm sido desenvolvidas e consolidadas através de documentação pelas agências regulatórias de cunho internacional, tais como as técnicas de manipulação asséptica, utilização de salas limpas e estabelecimento de vestimenta adequada, sistemas de ventilação e tratamento de ar, etc. (Whyte e Eaton, 2004).

Diversos são os problemas que podem vir a se manifestar nas diferentes fases do ciclo de vida de um determinado produto. Desde a manipulação da matéria-prima até a chegada nas mãos do consumidor final, uma série de fatores apresentam o potencial de deflagrar uma contaminação microbiana, comprometendo o seu desempenho e afetando consideravelmente a eficácia e segurança (Belart, 2009).

Os limites microbiológicos impostos para a fabricação de medicamentos podem variar baseando-se na natureza, particularidade e finalidade do produto em questão. Assim, os limites microbianos podem exigir desde a sua ausência absoluta, assumindo-se a esterilidade como conformidade desejada, ou sua presença em determinados parâmetros considerados aceitáveis, os quais não oferecem riscos à saúde, podendo ser restritas ou não a espécies microbianas estabelecidas, nos casos de produtos não estéreis. Considerando-se que os microrganismos estão presentes numa diversidade de ambientes, podendo adaptar-se às mais variadas situações ambientais, o controle microbiológico de produtos exerce um papel crítico na indústria farmacêutica, e visa identificar se as ações de controle e inibição de contaminação microbiana estão sendo realizadas em conformidade. Tanto as bactérias quanto os fungos são considerados microrganismos que requerem máxima atenção, assim como outras entidades biológicas que podem oferecer riscos à saúde, como no caso dos vírus (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

Em vista de se obter um nível satisfatório de qualidade microbiana nos fármacos produzidos, os principais aspectos que devem ser considerados na implementação de metodologias de controle são as fontes de disseminação e os mecanismos que viabilizam a contaminação. Em outras palavras, deve-se não só se atentar às vias mais conhecidas de contaminação microbiana, como as matérias-primas, equipamentos, áreas de produção, ambientes associados, colaboradores e materiais de embalagem, mas também às vias particulares de cada indústria farmacêutica (Souza, 2019).

1.4.1 AS SALAS LIMPAS E CLASSIFICAÇÃO

De acordo com o descrito nas Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, RDC N° 658, a qual aborda as principais fases pertinentes ao processo de fabricação, é necessário que não só os produtos, mas também os materiais relacionados, sejam protegidos contra a presença de microrganismos. Para toda mercadoria submetida à Vigilância Sanitária, é requerida uma produção, armazenamento, transporte e comercialização levando-se em consideração as potenciais fontes de contaminação microbiana, e respeito às recomendações estipuladas pelos órgãos reguladores (Brasil, 2022).

Assim, os ambientes industriais especializados devem ser projetados para garantir a integridade de produtos em operações de alto risco de contaminação. Nesse sentido, a tecnologia das salas limpas se manifesta com o intuito de estabelecer ambientes internos com parâmetros altamente controlados (fluxo de ar, pressão, temperatura e umidade, por exemplo), e objetivando inibir a contaminação por corpos particulados circulantes pelo ar, de natureza viável (microrganismos) e não viável (pó e poeira). Sendo assim, a limpeza do ar nesses ambientes está diretamente relacionada à concentração de impurezas particuladas, a qual é medida por meio da contagem de partículas (número de partículas por unidade de volume) (Schicht, 1985).

Acerca da relação de viabilidade das partículas e *status* de uma determinada área, o conceito de que os microrganismos não se dispõem no ar isoladamente, mas associados a corpos particulados, é amplamente conhecido e utilizado como fundamento. Isto é, as partículas não viáveis atuam, de certa forma, como veículo de difusão para partículas viáveis. Nesse contexto, a vigilância sobre as partículas de poeira presentes em um determinado local diz respeito à eficiência do sistema de filtração e troca de ar, e a avaliação microbiológica se relaciona com a eficácia em práticas de sanitização e/ou higienização, e contaminação através de operadores, materiais e equipamentos utilizados (Ludwig e Silva, 2020).

Baseando-se no estipulado pela farmacopeia nacional, o processo de classificação de limpeza do ar das áreas limpas é realizado a partir de uma análise de concentração de partículas em suspensão no ar, regulada atualmente pela ABNT NBR ISO 14644-1. Embora tal regulamento seja utilizado com base no número de partículas suspensas no ar de ambientes controlados (ideal para construção, preparo e manutenção desse tipo de instalação), ele não foi idealizado para caracterizar a natureza viável ou não viável das partículas, não sendo capaz de fornecer embasamento para uma relação direta entre o quantitativo de partículas não viáveis e concentração de partículas viáveis (Brasil, 2019a). Além disso, vale ressaltar que estudos apontam uma presença considerável de microrganismos classificados como viáveis, porém incapazes de crescer nos meios de cultura utilizados comumente, indetectáveis pelas metodologias convencionais, o que os torna conhecidos como VBNC, *Viable But Not Culturable* (Viável, mas não cultivável) (Damaso, Denoya e Quelle, 2016).

A principal preocupação da indústria farmacêutica é quanto à presença de contaminantes de natureza não viável em produtos, em especial produtos injetáveis. Isso porque essa classe de contaminante pode se difundir pelo ambiente tanto a partir de operadores quanto de materiais e equipamentos. Além disso, como sugerido acima, quanto menor o número de partículas existentes em uma sala limpa, menor será o quantitativo de

microrganismos carreados nesse espaço. Esse dado é verdadeiro em relação à contaminação de material particulado de origem humana, como por exemplo células de descamação, pelos, entre outros, uma vez que a potencial contaminação liberada por objetos inanimados seria essencialmente não viável (USP, 2013). A norma nacional ABNT NBR ISO 14644-1 descreve as classificações fundamentadas nos limites máximos de concentração de partículas em faixas de tamanho, como apresentado abaixo (Quadro 1) (Brasil, 2019a). Atenção maior é dada às partículas com tamanho $\geq 0,5 \mu\text{m}$.

<i>Número de classificação</i>	<i>Limites máximos de concentração (partículas/m³ de ar) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados</i>						
	<i>(N)</i>	<i>0,1 μm</i>	<i>0,2 μm</i>	<i>0,3 μm</i>	<i>0,5 μm</i>	<i>1 μm</i>	<i>5 μm</i>
ISO Classe 1	10	2					
ISO Classe 2	100	24	10	4			
ISO Classe 3	1 000	237	102	35	8		
ISO Classe 4	10 000	2 370	1 020	352	83		
ISO Classe 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29	
ISO Classe 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293	
ISO Classe 7				352 000	83 200	2 930	
ISO Classe 8				3 520 000	832 000	29 300	
ISO Classe 9				35 200 000	8 320 000	293 000	

Quadro 1 - Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.
Fonte: BRASIL (2019a).

No Quadro 2, por sua vez, pode-se visualizar um esquema comparativo de diferentes nomenclaturas de classificação das salas limpas e conferir as suas respectivas equivalências (Xavier *et al.*, 2017; Brasil, 2019a).

<i>OMS e EEC (GMP)</i>	<i>Estados Unidos (habitual)</i>	<i>ISO</i>
Classe A	Classe 100	ISO 5
Classe B	Classe 100	ISO 5
Classe C	Classe 10.000	ISO 7
Classe D	Classe 100.000	ISO 8

Quadro 2 - Comparação entre os diferentes sistemas de classificação de limpeza de ar.
Fonte: BRASIL (2019a)

Como observado, há a designação das áreas em classes A, B, C e D, seguindo as normas estabelecidas pelas Boas Práticas de Fabricação da União Europeia. No que diz respeito à classificação de salas limpas de acordo com a norma, os limites de partículas em suspensão são estabelecidos em duas categorias base, uma com a sala “em repouso” e a outra “em operação” (*at rest and in operation*). A primeira refere-se à ausência de atividade no local, enquanto a segunda indica produção normal e fluxo de colaboradores, albergando também operações de simulação e ensaios de *media fill* (Eudralex, 2008).

Em vista da manutenção das especificações exigidas para a classificação das áreas, as salas limpas e as demais zonas devem apresentar requisitos específicos quanto aos aspectos físicos e de comportamento dos colaboradores durante a operação. Assim é necessário que as superfícies expostas sejam lisas, contínuas, não porosas e apresentem conexões curvas entre parede, teto e piso, evitando o acúmulo de poeira e possibilitando uma melhor aplicação de soluções saneantes. Devem ser evitadas as barreiras físicas nas áreas, permitindo a sanitização diária por colaboradores devidamente treinados. Além disso, deve ser proibido o consumo de alimentos nas áreas produtivas, assim como a utilização de relógios, brincos, colares, aparelhos de celular, e qualquer outra possível fonte de contaminação por parte dos operadores, e disponibilizada vestimenta adequada para adentrar nos locais (Xavier *et al.*, 2017).

Outro método de suma importância para que se mantenha a qualidade do ar exigida, responsável por reduzir consideravelmente o quantitativo de partículas viáveis e não viáveis presentes em uma área, é o sistema de aquecimento, ventilação e condicionamento de ar (HVAC, *Heating, ventilation and air-conditioning*). De modo geral, esse sistema de tratamento de ar consiste em um pré-filtro, que auxilia na longevidade do filtro principal e evita o acúmulo de partículas que, naturalmente, iriam sobrecarregá-lo rapidamente, além de um filtro de alta eficiência na remoção de material particulado, chamado de filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Arrestance*) (Souza, 2019).

1.4.2 O MONITORAMENTO AMBIENTAL MICROBIOLÓGICO

De acordo com o deliberado pela *United States Pharmacopeia* (USP) acerca do programa de qualidade microbiológica de salas limpas e ambientes controlados associados, embora o seu pleno estabelecimento seja um fator crucial para o atendimento das exigências de qualidade e segurança de um determinado produto, as suas limitações são amplamente reconhecidas e evidenciadas pelas autoridades reguladoras. Ainda que sejam utilizadas metodologias computadorizadas, a avaliação microbiológica total de uma área em questão será dificilmente alcançada, pois os contadores de partículas são limitados à captação de partículas $\geq 0.5 \mu\text{m}$, e os microrganismos não se distribuem livremente no ar, mas usualmente associados a partículas de 10 a 20 μm . Outro ponto essencial que sustenta tal afirmação, é que a contagem de partículas de natureza viável e não viável pode variar de acordo com o ponto de amostragem e das atividades realizadas no local em questão (USP, 2013).

Apesar disso, por meio da realização do monitoramento ambiental de rotina é possível avaliar sistematicamente e obter dados acerca das condições microbiológicas de uma

determinada área e identificar se as metodologias de higienização impostas são efetivas, contribuindo para a redução da carga microbiana nas zonas de alto risco operacional. Não se limitando a isso, também se torna viável detectar alterações nas condições de controle por meio das taxas de contaminação obtidas, uma vez comparadas com o histórico de análises e limites especificados (Xavier *et al.*, 2017). Assim, de maneira geral, pode-se dizer que o fundamento que sustenta o desenvolvimento e possibilita a atuação de um programa de controle microbiológico ambiental adequado são os limites de alerta e ação específicos de cada zona limpa.

Para que o estabelecimento inicial dos limites de alerta e ação seja feito de forma adequada, os dados obtidos em estudos de qualificação das áreas devem ser utilizados. O limite de alerta está associado à tendência de contaminação, quando uma área apresenta um quantitativo consideravelmente superior às condições normais de operação. Por outro lado, ao ser excedido, o limite de ação determina quando uma área necessita de acompanhamento imediato e realização de ações corretivas (PDA, 2001). Para todos os efeitos, independente da forma como ambos os limites venham a ser estabelecidos, é necessário que seja através do programa de monitoramento ambiental e, uma vez determinados, deve-se instituir uma metodologia de detecção e análise de tendência microbiológica.

Além disso, os estudos de qualificação das áreas se demonstram igualmente relevantes para a determinação de pontos de amostragem de rotina. De acordo com Sutton (2010), durante a realização desses estudos é necessária a implementação de amostragens em duas diferentes condições, “em repouso” e “dinâmica”, para o fornecimento de informação útil. Isto é, locais com maior número de contagem e/ou idealmente posicionados para atuar como indicadores de condições microbiológicas inadequadas. Em suma, a determinação de limites de alerta e ação, assim como o estabelecimento de pontos de amostragem, deve ser sustentada pela realização de estudos de qualificação e análise de dados. Salienta-se que todas as informações necessárias para a reprodutibilidade da amostragem ambiental devem ser devidamente expressas em procedimento operacional padrão (POP's), integrando tópicos como limites especificados, frequência e duração da amostragem, equipamentos, técnicas utilizadas, etc.

No que diz respeito às orientações fornecidas pela *Food and Drug Administration* (FDA), os operadores atuantes em áreas relacionadas ao processamento de produtos estéreis podem afetar gravemente as condições de qualidade ambiental em salas limpas, e comprometer a segurança do fármaco manipulado. Nesse sentido, junto ao programa de monitoramento ambiental das áreas, deve-se igualmente estabelecer um programa de

vigilância, ou monitoramento pessoal, por meio da amostragem de superfície de EPIs (Equipamento de Proteção Individual), como jalecos e luvas. Determinando-se uma frequência estratégica de amostragem e leitura de resultados, pode-se averiguar se as práticas de assepsia dos colaboradores são realizadas como o instruído por profissionais qualificados e, possivelmente, rastrear possíveis fontes de contaminação cruzada através de práticas de investigação (FDA, 2004).

1.4.3 METODOLOGIAS E EQUIPAMENTOS DE AMOSTRAGEM

Dentre as diferentes metodologias existentes, a mais conhecida e amplamente difundida pelos programas de avaliação microbiológica ambiental é a amostragem por sedimentação, ou amostragem passiva pelo tempo, em placas contendo meios de cultura. Isso se dá devido ao fato da sua simplicidade e baixo custo, possibilitando fornecer dados qualitativos acerca das áreas analisadas, apenas expondo as placas em determinados pontos de amostragem selecionados. Apesar de simples e acessível, tal metodologia está sujeita à ação de interferentes, como, por exemplo, o fluxo de ar e a densidade das partículas no ambiente, o que desqualifica o método para avaliação quantitativa dos níveis de contaminação ambiental. Além disso, o tempo de exposição da placa aberta ao ambiente, sendo 4 horas o padrão de amostragem, pode levar ao ressecamento do meio de cultura utilizado e comprometer os resultados. Por sua vez, a determinação quantitativa da contaminação microbiana para um programa de monitoramento ambiental exige o emprego de equipamentos amostradores de ar. Essa técnica de amostragem ativa do ar consiste em amostrar determinados volumes de ar, no decorrer do tempo e em uma dada velocidade, que viabilizem a colisão de partículas em suspensão com a superfície do meio de cultura, seja inercialmente ou por ação de força centrífuga (Pereira, 2011; Gordon *et al.*, 2014).

Levando-se em consideração a capacidade dos microrganismos de se aderirem às mais variadas superfícies, como, por exemplo, de equipamentos, áreas produtivas e da vestimenta de operadores, o monitoramento ambiental deve considerar essas possíveis fontes de contaminação e realizar, igualmente, uma rotina de avaliação da superfície dos elementos associados às áreas de baixa tolerância microbiológica. Nesse sentido, a amostragem de superfície pode ser realizada com o auxílio de placas de contato (RODAC - *Replicate Organism Direct Agar Contact*), ou com a tradicional ferramenta de coleta, o *swab*. As placas RODAC são usualmente utilizadas para amostragem de superfícies planas e/ou EPIs, sendo posteriormente incubadas em estufas para quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs). O *swab* é empregado com o intuito de avaliar superfícies irregulares, não planas,

como junções das áreas limpas e partes dos equipamentos. Para esse tipo de amostragem, é necessário o auxílio de um diluente adequado ou meio para conservar a integridade da amostra, como a solução salina 0,9% estéril ou líquido para transporte (solução de Ringer, por exemplo), para que a avaliação microbiológica seja realizada por meio do plaqueamento de alíquotas determinadas em meios de cultura (Dallolio *et al.*, 2017).

A respeito do meio de cultura a ser utilizado, a *Japanese Pharmacopoeia XIV*, recomenda para a avaliação microbiológica de áreas de processamento de produtos farmacêuticos estéreis, que diferentes meios podem ser utilizados. Neste caso, para pesquisa de bactérias são indicados meios para cultivo de microrganismos aeróbios TSA (*tryptic soy agar*), BHI (*brain heart infusion*), ou o ágar nutriente; enquanto para fungos e leveduras, recomenda-se o TSA além do SDA (*sabouraud dextrose agar*), o PDA (*potato dextrose agar*), ou o GPA (*glucose peptone agar*), nas condições de 30 – 35 °C e 20 – 25 °C, respectivamente, por 5 dias (JP, 2011). Apesar da amplitude das recomendações expressas pela organização, existem ainda diversos outros parâmetros que podem ser utilizados para o isolamento de microrganismos de origem ambiental, desde o meio de cultura até as condições de cultivo (USP, 2013; Gordon *et al.*, 2014). Contudo, é comum a todos os protocolos e inerente ao programa de monitoramento ambiental a necessidade de testes de validação da metodologia que será utilizada para promover o crescimento e evidenciação dos microrganismos de interesse.

1.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A identificação de microrganismos se configura como um dos principais pilares do controle de qualidade microbiológico na indústria farmacêutica. Segundo as diretrizes definidas pela USP, os microrganismos detectados em matérias-primas, produtos em diferentes níveis de fabricação, água grau farmacêutico, materiais de embalagem e em áreas limpas de baixa tolerância microbiológica, devem ser submetidos à análise. Uma rotina de caracterização para se determinar a identidade do microrganismo isolado deve ser aplicada como o aspecto das colônias, morfologia e distribuição celular (bacilos, cocos, presença ou ausência de esporos, e etc.), resposta à coloração de Gram, ou outras técnicas de coloração diferencial, e apresentação de determinados perfis bioquímicos (como o teste da enzima oxidase para bactérias Gram-negativas, por exemplo) (USP, 2013).

A caracterização inicial orientará para uma identificação mais aprofundada, em nível taxonômico, revelando seu gênero e/ou espécie, com base no grau de correspondência com microrganismos padrão já conhecidos e existentes em bancos de dados. De modo geral, para

que uma identificação microbiológica completa seja realizada são necessários estudos fenotípicos e genotípicos. A caracterização fenotípica baseia-se na detecção das características observáveis, particularidades do microrganismo provenientes da expressão gênica, como, por exemplo, as condições ideais para o seu desenvolvimento (ex: concentrações de oxigênio no meio), assim como a morfologia celular e da colônia. Por sua vez, a caracterização genotípica fundamenta-se nos princípios da biologia molecular, analisando aspectos pertinentes ao genoma microbiano (ex: sequenciamento do gene *rrs* que codifica o RNA ribossômico, rRNA) (Andrade, 2017).

De acordo com o relatório técnico nº 33 da *Parental Drug Association* (PDA), sobre a avaliação, validação e implementação de métodos microbiológicos rápidos e alternativos, os métodos clássicos de identificação de microrganismos, apesar de largamente utilizados, são metodologias baseadas em técnicas de recuperação e cultivo microbiano que podem exigir tempo extenso para obtenção de resultados, o que pode prejudicar o andamento de análises investigativas sobre contaminação de produtos, por exemplo (PDA, 2013). Embora as limitações de metodologias clássicas sejam bem reconhecidas, o processo de aceitação e implementação de novos métodos de identificação microbiológica ainda têm ocorrido lentamente, devido à grande dificuldade de demonstrar equivalência de métodos alternativos aos pré-existentes, fato esse que dificulta a avaliação, a validação e a aprovação da utilização dessas tecnologias, as quais potencialmente são superiores aos métodos clássicos.

Nas últimas décadas, as metodologias de identificação rápida prosperaram e se difundiram consideravelmente, procurando otimizar procedimentos e técnicas já existentes e bastante utilizadas, o que resultou em uma grande influência nos métodos atuais por parte da tecnologia computadorizada, da utilização de equipamentos, banco de dados, e aplicações de conceitos e metodologias da físico-química, bioquímica, imunologia e biologia molecular. Assim sendo, os métodos rápidos em identificação microbiológica são definidos como técnicas voltadas para uma caracterização devidamente embasada e em menor tempo, quando comparadas com técnicas convencionais (Borin, Martins e Taketani, 2022).

Métodos analíticos ágeis no âmbito microbiológico apresentam características positivas para a identificação de microrganismos que se deseja estudar, e podem ser implementados em vários setores, não só da indústria farmacêutica, mas também na perícia criminal, diagnósticos clínicos e análises ambientais. Em meio aos variados métodos analíticos de identificação existentes, pode-se citar aqueles realizados por meio de provas bioquímicas (como o Bactray da Laborclin®, o sistema BBL Crystal®, e as galerias API®), de perfis de ácido graxo (Sherlock®), de reações imunológicas (VIDAS®), e de

espectrometria de massas de cada microrganismo (baseada na tecnologia MALDI-TOF) (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

Dentre os métodos supracitados, destaca-se o MALDI-TOF MS (*Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*). Esta técnica é utilizada para determinar o perfil de proteínas entre 2 e 20 KDa que compõem uma determinada amostra, baseando-se no espectro formado a partir da análise das moléculas em função da razão massa/carga (Andrade, 2017). A comparação dos espectros obtidos com aqueles originados a partir de microrganismos de referência permite a identificação das amostras de microrganismos. O MALDI-TOF atrai interesse analítico devido à sua rápida, precisa e sensível identificação, sendo capaz de sinalizar, muitas vezes, o gênero e a espécie de uma gama de microrganismos previamente cultivados, sejam eles bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, desde que referência semelhante esteja incluída no banco dos dados. Além disso, outros aspectos como a demanda por reagentes de baixo custo e fácil interpretação dos resultados obtidos tornam essa técnica muito atraente (Tsung Yun, Chuang e Shih-hua, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

A importância do rastreamento de possíveis fontes de contaminação microbianas a partir da identificação do gênero e espécie de microrganismos isolados em ambientes industriais controlados, através de metodologias de amostragem de ar é amplamente demonstrada. O levantamento de dados dessa natureza não só atua de forma complementar às análises de contagem de microrganismos com base em limites estabelecidos, mas também auxilia no estabelecimento de medidas que visam mitigar ou reduzir os riscos de contaminação do produto fabricado.

Abordando-se uma perspectiva de caráter mais técnico, a realização deste trabalho embasa-se igualmente nas orientações da ANVISA acerca das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, dispostas na RDC N° 301, as quais abordam as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Estéreis. A Instrução Normativa n° 35 de 2019 (Brasil, 2019b), salienta a necessidade de fabricação de medicamentos estéreis ser realizada em salas limpas, com baixos níveis de tolerância para contaminantes ambientais de natureza física, química e biológica, para a manutenção da segurança e conformidade dos produtos fabricados.

Além disso, o presente estudo materializa a aproximação da Universidade Federal com o setor industrial, por meio da complementação da formação em nível superior e desenvolvimento profissional, promovendo uma maior inserção dos estudantes no mercado de trabalho. A graduação oferecida pelo IMPG apresenta uma base sólida de conhecimentos que permitem uma aplicação mais direcionada e exploração de linhas de pesquisa relacionadas aos interesses da indústria, em especial o controle de qualidade, uma das principais e mais importantes áreas desse segmento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a identificação dos microrganismos isolados por meio do monitoramento ambiental rotineiro de áreas produtivas de uma indústria farmacêutica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Empregar as técnicas básicas de microbiologia para a recuperação e isolamento de microrganismos detectados pelo monitoramento ambiental do ar, por amostragem volumétrica e por sedimentação, de salas limpas e ambientes controlados de uma indústria farmacêutica;
2. Descrever a frequência de isolamento de colônias possivelmente bacterianas ao longo do monitoramento ambiental realizado nas 7 áreas analisadas;
3. Identificar os microrganismos isolados;
4. Descrever a frequência e distribuição dos microrganismos identificados pelas áreas analisadas no referido tempo de amostragem;
5. Discutir os resultados à luz dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de microbiologia, tanto no que diz respeito à performance das técnicas utilizadas quanto da natureza e risco associados aos microrganismos identificados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado em parceria técnico-científica, na celebração de um termo de sigilo e confidencialidade, entre uma indústria farmacêutica nacional e um laboratório de pesquisa universitário. Este projeto de pesquisa visou a identificação dos microrganismos isolados pelo programa de monitoramento ambiental vigente na indústria farmacêutica, referente aos meses de maio e junho de 2022. O programa apresentava como locais de análise as salas limpas de áreas produtivas, relacionadas à fabricação de produtos injetáveis e orais, e também de ambientes controlados associados, totalizando 7 locais de amostragem da fábrica (Quadro 3).

Áreas	Descrição
A1	Ambientes destinados a atividades avaliativas e aferição de matéria-prima, além de outros aspectos pertinentes às etapas iniciais anteriores à fabricação do produto.
A2	
A3	Preparo do produto, mistura de componentes.
A4	Fracionamento e acondicionamento do produto em recipientes.
A5	Higienização de recipientes e outros elementos relacionados aos produtos e/ou produção.
A6	Vedação de recipientes dos produtos fabricados.
A7	Área de fabricação de produtos de via oral.

Quadro 3 - Descrição das atividades realizadas nas áreas analisadas no estudo.

O programa de monitoramento ambiental e avaliação das condições microbiológicas das áreas foi feito todos os dias em que havia produção ou atividade em uma determinada sala, baseando-se no plano mestre de produção ou sob demanda sinalizada pela gestão. A metodologia de avaliação desenvolvida e validada pela indústria era a de amostragem por sedimentação e a amostragem ativa por equipamento amostrador de ar (MiniCapt®), sendo a primeira realizada dentro do período máximo padrão de 4 horas e a segunda nos parâmetros de 1000 L/m³ por 10 minutos, com apenas uma placa para cada ponto amostrado.

Assim, os microrganismos foram isolados através do monitoramento ambiental pelas duas metodologias: monitoramento volumétrico (ar ativo) e monitoramento por sedimentação, sendo o único meio de cultura utilizado para cultivo de bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes) o Ágar Triptona de Soja (TSA), distribuído em placas de petri de 90x15mm, e submetido à teste de promoção de crescimento com cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*. A frequência de amostragem variou de acordo com a área e os pontos especificados. Isto é, a frequência baseou-se na atividade desempenhada em uma determinada área e a criticidade da atividade ali realizada. Desta forma, o monitoramento por sedimentação foi realizado sob

demanda, diariamente, em dias da semana específicos, semanalmente, ou mensalmente com variância da semana para análise. Quanto ao monitoramento por ar ativo, realizou-se a amostragem diariamente, semanalmente com alternância entre pontos, em dias da semana específicos ou mensalmente em dias específicos com alternância entre pontos.

Todas as áreas cobertas pelo monitoramento enquadraram-se em uma classificação de tolerância de partículas viáveis, com níveis de conformidade, alerta e ação especificados, determinados por estudos de validação internos. Assim sendo, a pesquisa aqui desenvolvida trabalhou com áreas classificadas submetidas às normas expressas pelas Boas Práticas de Fabricação da União Europeia, havendo áreas classe A, C e D. Não havia áreas de classe B na classificação vigente.

4.2 PROCESSAMENTO DAS PLACAS DE AMOSTRAGEM

Dentro do programa de monitoramento ambiental da indústria, o processo de incubação dos meios de cultura e promoção de crescimento dos possíveis microrganismos recuperados foi realizado após o término das atividades de cada área da fábrica. As placas foram enviadas ao laboratório de microbiologia com a devida identificação para fins de rastreabilidade. Isto é, indicaram-se informações a respeito da área e ponto amostrado, além do produto fabricado no dia, lote, operador responsável pela amostragem, hora e data da amostragem, e o saneante utilizado na prática de higienização do local.

Duas condições de incubação foram adotadas inicialmente, as placas foram mantidas em estufa regulada a $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 48h. Após esse período, as culturas eram analisadas e as UFCs contadas e registradas. Então, as placas foram novamente incubadas a $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por 72h. Essa estratégia foi utilizada para fins de estabelecer condições mais abrangentes e promover um melhor crescimento da diversidade de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, com diferentes condições ideais de crescimento, que possivelmente tenham sido captados pela amostragem.

Após esse período, as culturas foram analisadas quanto à contagem de UFCs e registro definitivo das condições microbiológicas das áreas. A atividade de leitura e contagem das UFCs foi realizada com o auxílio do contador eletrônico de colônias (Quimis®), enquanto que o registro e comparação com os limites (estabelecidos por estudos de validação das áreas) foi feito através de documentação interna da fábrica.

No que diz respeito às características das UFCs encontradas, considerou-se como bactéria todas as não filamentosas, enquanto que as filamentosas foram diretamente

classificadas como fungos. Posteriormente, os dados foram compilados e organizados em planilhas, explicitando todas as informações supracitadas para rastreabilidade.

4.3 SELEÇÃO E REPIQUE DAS CULTURAS ISOLADAS

Adentrando nas etapas realizadas em laboratório universitário, a caracterização microbiana desenvolvida pelo estudo em questão foi voltada apenas para as UFCs isoladas do monitoramento ambiental do ar, seja ativo ou por sedimentação, independentemente da ultrapassagem ou não dos níveis de alerta e ação. Ou seja, foram registradas e designadas para a identificação por espectrometria de massas (Bruker®) (Figura 2) pela técnica de MALDI-TOF MS todas as colônias microbianas não filamentosas, com a captação de uma representante de cada morfotipo. A identificação de fungos não foi contemplada entre os objetivos deste estudo.



Figura 2 – Espectrômetro de massas (Bruker®).

Fonte: O próprio autor.

Após o processamento das amostras e registro das UFCs, todas as placas que apresentaram crescimento microbiano foram separadas. Seguindo uma rotina de análise semanal, submeteu-se as amostras à identificação no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM).

No que concerne às colônias isoladas, com a placa dividida em quadrantes, realizou-se a purificação pela técnica de semeadura por esgotamento em meio de cultura TSA (Difco®) (Figura 3), havendo a identificação de qual mês, dia e área o microrganismo foi isolado, gerando uma codificação sequencial indicando tais informações mais uma numeração específica do microrganismo, para fins de rastreabilidade.

Após a realização do repique, todas as placas foram submetidas à incubação nas condições de 37 °C ou 25°C (quando necessário) por 18-24h.

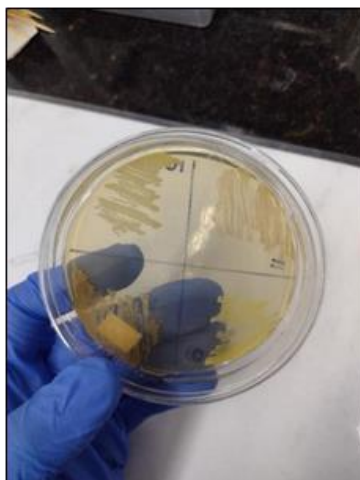


Figura 3 - Semeadura por esgotamento das colônias microbianas isoladas em meio de agar TSA.

Fonte: O próprio autor.

4.4 IDENTIFICAÇÃO PELO MALDI-TOF

A identificação dos microrganismos foi realizada em duplicata. Parte da massa microbiana das placas de petri foi captada com a ponta de um palito de madeira e aplicada em movimentos circulares em duas regiões delimitadas da placa metálica de 96 *spots*.

Uma vez que todas as colônias foram dispostas na placa, aplicou-se 1 μ L de ácido fórmico (concentração de 70%) em cada *spot* (Figura 4A). Após a secagem do primeiro reagente, aplicou-se ainda 1 μ L de matriz CHCA (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) (concentração de 10 mg/mL). Então, a placa metálica foi direcionada ao orifício de encaixe com o equipamento e as análises de identificação foram conduzidas de acordo com o procedimento indicado pelo fabricante (Figura 4B).

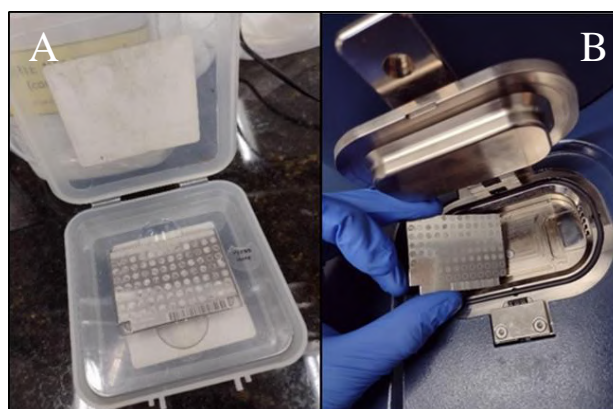


Figura 4 – **A:** Alíquotas de crescimento microbiano aplicadas na placa metálica de 96 *spots* e tratadas com ácido fórmico e a matriz; **B:** Placa metálica sendo disposta no encaixe do equipamento com as amostras dispostas nos *spots*.

Fonte: O próprio autor.

Os dados gerados pelas análises do MALDI-TOF, por sua vez, foram analisados por dois softwares, sendo o primeiro o flexControl™ (Bruker®), voltado para a configuração e operação das espectrometrias de massas, e o MALDI Biotyper®, um sistema designado para interpretação e identificação microbiana a partir dos espectros obtidos.

A interpretação dos resultados obtidos foi feita a partir da consideração de *score value* aceitável na faixa entre 1,700 até 3,000, referente ao grau de qualidade de correspondência entre os espectros das amostras e os presentes no banco de dados, permitindo-se selecionar apenas os resultados que apresentaram no mínimo uma provável identificação de gênero (Quadro 5).

Faixa	Descrição
2.300 ... 3.000	Identificação de espécies altamente provável
2.000 ... 2.299	Identificação segura de gênero, identificação provável da espécie
1.700 ... 1.999	Provável identificação de gênero
0.000 ... 1.699	Identificação não confiável

Quadro 5 - Significado e interpretação do *score value*.

5 RESULTADOS

Os resultados aqui expressos provêm de informações de duas naturezas: i) dados extraídos da planilha do programa de monitoramento ambiental rotineiro do laboratório industrial de controle de qualidade microbiológico; e ii) a identificação dos microrganismos isolados do monitoramento ambiental. Em ambos os casos, os meses analisados foram maio e junho do ano de 2022.

5.1 QUANTIFICAÇÃO MICROBIANA A PARTIR DO MONITORAMENTO AMBIENTAL

A contagem das UFCs pertinentes ao programa de monitoramento ambiental para os meses de maio e junho (Figura 6) foi realizada nas culturas obtidas através das duas metodologias de coleta de ar empregadas, sedimentação espontânea (azul) e a de ar ativo (vermelho). Assim, estão expressos os totais das UFCs potencialmente bacterianas de cada área, representando o somatório dos pontos de amostragem de cada uma. As áreas A1, A2 e A4 não foram amostradas pela técnica de ar ativo.

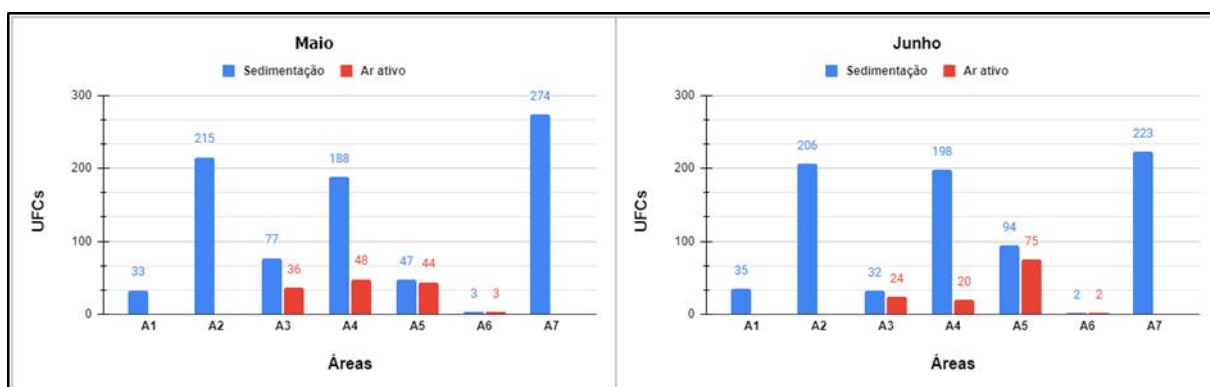


Figura 6 – Quantificação de bactérias aeróbias mesófilas do ar em diferentes áreas^a de uma linha de produção de medicamentos nos meses de maio e junho de 2022.

A partir dos dados apresentados na Figura 7 observou-se, no mês de maio, que nas áreas A3 e A4, contempladas por ambas as metodologias de amostragem, a contagem de UFCs isoladas pela amostragem por sedimentação foi maior do que as isoladas pela amostragem por ar ativo, sendo que em A3 a diferença foi de 41 UFC, enquanto A4 apresentou uma diferença ainda maior, de 140 UFC. Essa diferença maior foi obtida também na área A4 em relação ao mês de junho (178 UFC). De uma forma geral, a área A3 teve contagens maiores em maio do que em junho.

^aDescrição das atividades realizadas nas áreas analisadas no estudo: A1 e A2 – Atividades avaliativas e aferição de matéria-prima, além de outros aspectos pertinentes às etapas iniciais à fabricação do produto; A3 – Preparo do produto, mistura de componentes; A4 – Fracionamento e acondicionamento do produto em recipientes; A5 – Higienização de recipientes e outros elementos relacionados aos produtos e/ou produção. A6 – Vedação de recipientes dos produtos fabricados; A7 – Fabricação de produtos de via oral.

No que diz respeito às áreas A5 e A6, foi observado que, em maio, A5 teve contagens semelhantes entre as duas técnicas (47 e 44 UFCs), mas em junho essa diferença aumentou, com 94 para sedimentação e 75 para coleta ativa.

Para A6 as contagens em maio e junho foram igualmente muito baixas para as duas técnicas de amostragem. Em praticamente todas as áreas, com exceção da A6, a amostragem por sedimentação apresentou maior contagem de UFCs bacterianas do que a de ar ativo.

Realizando-se uma análise mais abrangente, para fins comparativos dos resultados das contagens de UFCs por amostragem de sedimentação entre os dois meses e entre todas as áreas (Figura 7), foi possível notar que A7 apresentou o maior número de UFCs, sendo seguido de A2 e, posteriormente por A4. No caso das áreas A3 e A5, ambas alternaram em relação às contagens, com maior número de UFC, sendo A3 maior em maio, enquanto que A5 foi maior em junho. A1 e A6, por sua vez, foram as áreas com as menores contagens nos dois meses.

Em relação às diferenças expressas entre as contagens de UFCs reveladas pela amostragem de sedimentação, entre maio e junho, A5 apresentou a maior mudança com aumento de 100%. Em seguida, as áreas A3, A6 e A7 reduziram em 58%, 33% e 18%, respectivamente. As áreas com mudanças menores foram A1 e A4 com aumento de 6% e 5%, respectivamente, e A2 com redução de 4%.

Abordando-se da mesma forma os resultados obtidos por meio da amostragem por ar ativo, observou-se que a maior mudança ocorreu em A5, com aumento de 70%, enquanto que as outras áreas reduziram em 58% (A4) e 33% (A6 e A3). Embora não seja possível realizar uma análise comparativa entre as UFCs expressas pelas duas metodologias supracitadas, no que diz respeito às áreas A1, A2 e A7, foi possível observar que, tanto no mês de maio quanto no mês de junho, a contagem na amostragem de sedimentação seguiu a mesma ordem crescente de $A1 < A2 < A7$.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Considerando a inspeção visual das colônias crescidas quando das contagens de UFCs, e a seleção de um representante de cada tipo observado, foram submetidos à identificação por MALDI-TOF um total de 956 amostras, sendo 490 no mês de maio e 466 no mês de junho. Destas, 697 (360 recuperadas em maio e 337 amostras recuperadas em junho) apresentaram, como resultado, identificações de bactérias com *score value* acima de 1,700, ou seja, com provável identificação do gênero; 203 amostras (89 de maio e 114 de junho) apresentaram resultados não confiáveis, ou seja, com *score* abaixo de 1,700; 43 amostras não puderam ser

analisadas pela falta de picos nos espectros (34 de maio e 9 de junho); e 13 amostras foram identificadas como leveduras (7 de maio e 6 de junho).

5.3 ESTRATIFICAÇÃO EM GRUPOS BACTERIANOS

Os resultados encontrados em relação às sete áreas analisadas quanto aos microrganismos identificados como GP (gram-positivos) e GN (gram-negativos), ao longo das cinco semanas de cada mês, para os dois meses amostrados, pode ser observada nas Tabelas 1 (maio) e 2 (junho). A designação "N/A" ("não se aplica") refere-se às semanas em que não houve demanda de amostragem na área em questão.

Tabela 1 – Estratificação quanto aos grupos bacterianos GP e GN de bactérias aeróbias mesófilas isoladas do ar das salas amostradas semanalmente durante o mês de maio.

Área	Maio - Identificações										Total
	1º Semana		2º Semana		3º Semana		4º Semana		5º Semana		
	GP ^a	GN ^b	GP	GN	GP	GN	GP	GN	GP	GN	
A1	8	1	3	0	8	0	3	1	1	0	25
A2	17	0	30	1	28	2	6	0	10	0	94
A3	6	2	7	0	5	0	8	0	1	0	29
A4	21	2	14	1	27	2	3	0	8	0	78
A5	16	3	N/A ^c								19
A6	1	0	N/A		3	0			N/A		4
A7	32	2	18	1	58	0			N/A		111
Total de amostras do mês											360

^aGP – gram-positivos.

^bGN – gram-negativos.

^cN/A – não se aplica.

Tabela 2 – Estratificação quanto aos grupos bacterianos GP e GN de bactérias aeróbias mesófilas isoladas do ar das salas amostradas semanalmente durante o mês de junho.

Área	Junho - Identificações										Total
	1º Semana		2º Semana		3º Semana		4º Semana		5º Semana		
	GP ^a	GN ^b	GP	GN	GP	GN	GP	GN	GP	GN	
A1	2	0	2	0	7	0	4	0	5	0	20
A2	11	0	19	0	10	0	16	4	22	0	82
A3	5	0	14	0	5	0	10	1	N/A ^c		35
A4	17	1	18	0	12	2	4	2	7	0	63
A5	18	1	37	0	N/A						56
A6	2	1			N/A		2	0	N/A		5
A7	N/A				11	0	36	3	24	2	76
Total de amostras do mês											337

^aGP – gram-positivos.

^bGN – gram-negativos.

^cN/A – não se aplica.

A Figura 5 mostra o número de microrganismos isolados nas áreas entre cocos gram-positivos (CGP), bacilos gram-positivos (BGP) e bacilos gram-negativos (BGN), com o somatório de todas as semanas dos meses analisados.

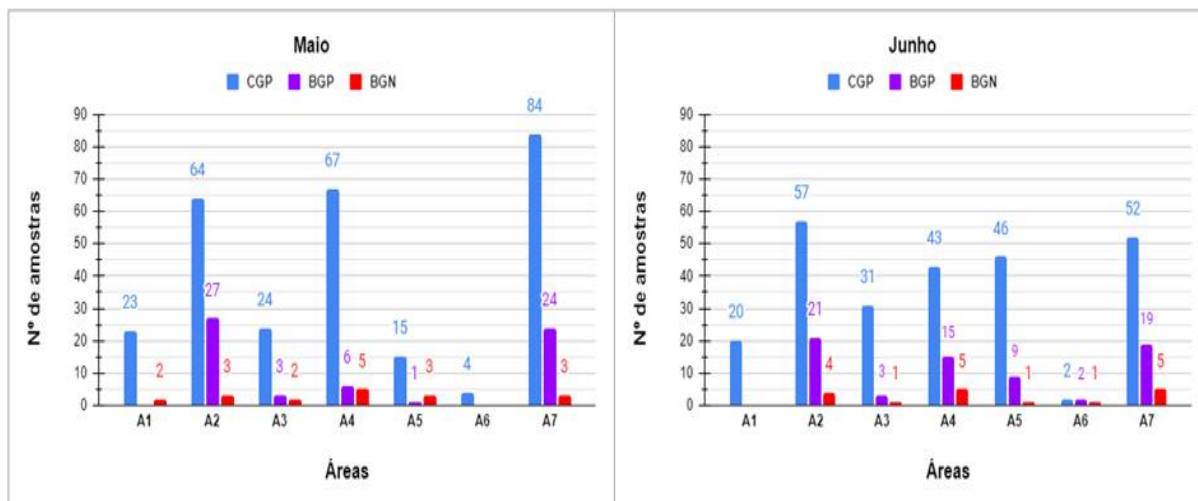


Figura 5 - Número de amostras de cocos gram-positivos (CGP), bacilos gram-positivos (BGP) e bacilos gram-negativos (BGN) de bactérias aeróbias mesófilas recuperadas do ar nos meses de maio e junho, de acordo com cada área amostrada.

A partir dos resultados apresentados acima, observou-se que, para o mês de maio, bactérias classificadas como CGP apresentaram-se em maior número ($n=281$) do que BGP ($n=62$) e BGN ($n=18$). Além disso, CGP foram identificados em todas as sete áreas analisadas, enquanto que BGP estavam ausentes das áreas A1 e A6, e BGN ausentes apenas na A6.

No que diz respeito ao mês de junho, por sua vez, notou-se igualmente que CGP se apresentaram em maior número do que os demais grupos (250 amostras). Apesar do menor número de CGP na A6, esse grupo bacteriano foi detectado em todas as áreas, enquanto BGP e BGN se ausentaram apenas nas culturas da área A1.

Os grupos bacterianos identificados em relação às metodologias de amostragem de ar utilizadas nas áreas estão apresentados nas Tabelas 3 (maio) e 4 (junho). De forma geral, a captação de ar por sedimentação apresentou um maior número de UFCs em comparação com a metodologia de ar ativo, com exceção da A5. Além disso, observou-se também que grande parte dos microrganismos do grupo CGP foram obtidos por meio da técnica de sedimentação do ar.

Tabela 3 – Distribuição dos grupos bacterianos CGP, BGP e BGN de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas de acordo com as metodologias de amostragem, no mês de maio.

Área	Sedimentação - Maio			Ar Ativo - Maio			Total
	CGP ^a	BGP ^b	BGN ^c	CGP	BGP	BGN	
A1	23	0	2	N/A ^d	N/A	N/A	25
A2	64	27	3	N/A	N/A	N/A	94
A3	16	2	2	8	1	0	29
A4	55	3	5	12	3	0	78
A5	10	0	1	5	1	2	19
A6	4	0	0	0	0	0	4
A7	84	24	3	N/A	N/A	N/A	111
Total de amostras do mês							360

^aCGP - cocos gram-positivos.

^bBGP - bacilos gram-positivos.

^cBGN - bacilos gram-negativos.

^dN/A - Não se aplica.

Tabela 4 – Distribuição dos grupos bacterianos CGP, BGP e BGN de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas de acordo com as metodologias de amostragem, no mês de junho.

Área	Sedimentação - Junho			Ar Ativo - Junho			Total
	CGP ^a	BGP ^b	BGN ^c	CGP	BGP	BGN	
A1	20	0	0	N/A ^d	N/A	N/A	20
A2	57	21	4	N/A	N/A	N/A	82
A3	21	2	0	10	1	1	35
A4	32	14	4	11	1	1	63
A5	17	4	0	29	5	1	56
A6	2	2	1	0	0	0	5
A7	52	19	5	N/A	N/A	N/A	76
Total de amostras do mês							337

^aCGP - cocos gram-positivos.

^bBGP - bacilos gram-positivos.

^cBGN - bacilos gram-negativos.

^dN/A - Não se aplica.

5.4 ESPÉCIES BACTERIANAS IDENTIFICADAS

5.4.1 GRUPO DOS COCOS GRAM-POSITIVOS (CGP)

As amostras pertencentes ao grupo dos CGP, dos gêneros *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., foram identificadas quanto à espécie através da metodologia de MALDI-TOF com o objetivo de descrever eventuais mudanças no perfil microbiano no período amostrado (Tabela 5).

Assim, na área A1 foi possível notar que de maio para junho houve um decréscimo na diversidade de espécies de *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. A espécie predominante em ambos os meses foi *Micrococcus luteus*, com uma frequência de 36,0% em maio e 50,0% em junho, do total de 25 e 20 amostras, respectivamente. A espécie *Micrococcus endophyticus* foi detectada apenas uma vez, em maio.

Em relação ao grupo *Staphylococcus* spp., foi possível observar uma alteração no cenário microbiano entre ambos os meses. Em maio, notou-se que a espécie *Staphylococcus hominis* predominou cerca de 16,0%, sendo seguida por *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* com 8,0%, e outras espécies em menores proporções. Ao analisar-se o mês de junho, foi possível notar que *S. haemolyticus* representou 20,0% do total, enquanto que os outros 20,0% foram divididos entre *Staphylococcus warneri*, *S. epidermidis* e *Staphylococcus aureus*.

Na área A2, para ambos os meses, observou-se maior frequência dos mesmos gêneros. *M. luteus* predominou 28,7% das 94 amostras em maio, enquanto que em junho representou uma parcela ainda maior de 34,1% das 82 totais, sendo a única espécie de *Micrococcus* spp. encontrada no primeiro mês, e no segundo dividindo a presença com *M. endophyticus* (1,2%). Por outro lado, *Staphylococcus saprophyticus* foi encontrado em 26,6% das amostras no mês de maio, mas decaiu para 20,7% em junho, apesar de ainda ter se mantido maior do que as demais espécies, não houve mudança significativa no quantitativo. Porém, observou-se que o *S. warneri*, foi detectado somente em maio, e *Staphylococcus cohnii* e *M. endophyticus* foram detectados somente em junho.

No que concerne à A3, em ambos os meses foi detectado *M. luteus* com 24,1% e 37,1% das amostras totais de maio (29) e junho (35), respectivamente. No primeiro mês, em contrapartida ao visto até o momento, *S. warneri* foi a segunda espécie com maior representatividade, estando logo à frente do *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. hominis* com iguais parcelas de 10,3%, além de *S. capitis* e *Staphylococcus arlettae* com 3,4%.

No mês de junho, as espécies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. warneri* foram as mais frequentes em relação ao grupo *Staphylococcus* spp., com 14,3% para o primeiro, e

11,4% para as duas últimas, sendo seguidas por mais três espécies em menor frequência (2,9%).

Por fim, observou-se que ambos os meses apresentaram o mesmo quantitativo de espécies dos gêneros de interesse, mas com algumas mudanças com a passagem do tempo, como a detecção apenas em maio de *S. arlettae* e *S. capitis*, e do aparecimento de *S. saprophyticus* e *Staphylococcus pasteurii* em junho.

Ao observar-se A4, mais especificamente no mês de maio, notou-se que dentre as 11 espécies dos gêneros de interesse, 10 foram identificadas como pertencentes ao grupo *Staphylococcus* spp. Nesse sentido, *S. haemolyticus* apresentou a maior porcentagem com 10,2% das 78 amostras totais, sendo seguida por *S. cohnii* (7,7%), *S. epidermidis* e *S. hominis*, ambas com iguais parcelas de 6,4%. Outras espécies como *S. capitis*, *Staphylococcus caprae*, *S. warneri* foram menos frequentes. *M. luteus* foi isolado em maio de 24,3% das amostras, enquanto no mês de junho, representou 27,0% (63). Uma amostra foi identificada em junho como *Micrococcus lylae*. No mês de junho, para *Staphylococcus* spp. as 7 espécies identificadas foram detectadas em pequenas porcentagens. Com relação à diversidade de espécies entre os meses amostrados na área supracitada, notou-se que as espécies *Staphylococcus nepalensis*, *Staphylococcus succinus* e *Staphylococcus lugdunensis* foram detectadas apenas em maio.

Na área A5 observou-se em maio que dentre os 19 CGP totais identificados, a maioria era de *Staphylococcus* spp. (52,6%), sendo *S. arlettae* (21,0%) e *S. hominis* (15,8%) as espécies mais numerosas. *M. luteus* foi encontrado em 21,10% das amostras. Logo atrás obteve-se *S. hominis* com 15,8% de representatividade, enquanto *S. capitis* e *S. haemolyticus* apresentaram 10,5% e 5,3%, respectivamente. No mês de junho, *M. luteus* foi isolado em 26,8% das amostras, sendo que *M. luteus* foi mais frequente (17,9%) e *M. lylae*, uma espécie menos comum, foi identificada em 8,9% das amostras. Entre os *Staphylococcus* spp. (41,1%), *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. epidermidis*, com 12,5% cada, foram os mais frequentes.

Na área A6 foi identificado nos dois meses um pequeno número de bactérias com a presença *Micrococcus luteus* somente em maio e espécies de *Staphylococcus* spp. (*S. cohnii* e *S. epidermidis*, *S. hominis*) nos dois meses.

Por fim, para a área A7, foi possível notar que dentre a diversidade de espécies de *Staphylococcus* spp. identificadas no primeiro mês, *S. hominis* foi mais presente (14,4%), seguida por *S. haemolyticus* e *S. capitis*, (ambos 11,7%), e *S. epidermidis* (7,2%). Outras espécies mostraram porcentagens mais baixas de identificação frente ao total de CGP. *M. luteus* foi a espécie mais frequente em maio (15,3%) e em junho (15,8%).

No mês de junho foram identificadas duas espécies de *Micrococcus* spp. não observadas no mês anterior, *M. endophyticus* e *Micrococcus flavus*, ambas com 1,3%. O que se observou para *Staphylococcus* spp. neste mês foi a maior presença de *S. haemolyticus*, apresentando 13,2%, e logo em seguida *S. capitis* com 5,3%.

Tabela 5 – Identificação quanto à espécie das amostras do grupo de CGP de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas ao longo dos dois meses de amostragem.

		Número de CGP identificados nas áreas ao longo dos dois meses						
		Áreas						
Mês	Microorganismos	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Maio	<i>Micrococcus</i> spp.	10	27	7	19	4	2	18
	<i>M. luteus</i>	9	27	7	19	4	2	17
	<i>M. endophyticus</i>	1	-	-	-	-	-	-
	<i>M. lylae</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>M. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus</i> spp.	11	32	16	37	10	2	61
	<i>S. haemolyticus</i>	2	-	3	8	1	-	13
	<i>S. hominis</i>	4	1	3	5	3	-	16
	<i>S. epidermidis</i>	2	3	3	5	-	1	8
	<i>S. warneri</i>	1	2	5	3	-	-	4
	<i>S. saprophyticus</i>	1	25	-	-	-	-	1
	<i>S. lugdunensis</i>	1	-	-	2	-	-	1
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. cohnii</i>	-	-	-	6	-	1	5
	<i>S. arlettae</i>	-	-	1	-	4	-	-
	<i>S. caprae</i>	-	-	-	3	-	-	-
	<i>S. pasteurii</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. succinus</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>S. capitis</i>	-	1	1	3	2	-	13
	<i>S. nepalensis</i>	-	-	-	1	-	-	-
	Outros	4	35	6	22	5	-	32
	Amostras totais	25	94	29	78	19	4	111
Junho	<i>Micrococcus</i> spp.	10	29	13	18	15	-	14
	<i>M. luteus</i>	10	28	13	17	10	-	12
	<i>M. endophyticus</i>	-	1	-	-	-	-	1
	<i>M. lylae</i>	-	-	-	1	5	-	-
	<i>M. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>Staphylococcus</i> spp.	8	25	16	14	23	2	30
	<i>S. haemolyticus</i>	4	-	4	3	7	-	10
	<i>S. hominis</i>	-	1	1	2	7	1	2
	<i>S. epidermidis</i>	1	2	5	2	7	1	3
	<i>S. warneri</i>	2	-	4	2	2	-	3
	<i>S. saprophyticus</i>	-	17	1	-	-	-	3
	<i>S. lugdunensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	1	-	-	-	-	-	-
	<i>S. cohnii</i>	-	2	-	1	-	-	1
	<i>S. arlettae</i>	-	-	-	-	-	-	2
	<i>S. caprae</i>	-	-	-	2	-	-	-
	<i>S. pasteurii</i>	-	-	1	-	-	-	2
	<i>S. succinus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. capitis</i>	-	3	-	2	-	-	4
	<i>S. nepalensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Outros	2	28	6	31	18	3	32
	Amostras totais	20	82	35	63	56	5	76

Os resultados expostos anteriormente evidenciaram mais acuradamente a relação de espécies de CGP identificadas para cada área e para cada mês, com destaque nos principais gêneros (*Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp.) e na variação de diversidade microbiana ao longo do tempo. Na Tabela 6, foram compilados os dados a partir do agrupamento de todas as áreas, de ambos os meses amostrados e somando-se o total de CGP identificados. Nesse sentido, dentre as 532 identificações de espécies de CGP, a maior porcentagem foi referente a *M. luteus* (33,0%), seguida por *S. haemolyticus*, representando 10,3%, e de outras espécies do grupo *Staphylococcus* spp., como *S. saprophyticus* (9,0%), *S. hominis* (8,6%) e *S. epidermidis* (8,3%).

Tabela 6 – Predominância de espécies referentes aos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. de bactérias aeróbias mesófilas do ar frente ao total de amostras identificadas do grupo de CGP.

Número de CGP totais identificados		
Microrganismo	nº de amostras	%
<i>Micrococcus</i> spp.	186	35,0
<i>M. luteus</i>	175	33,0
<i>M. lylae</i>	7	1,3
<i>M. endophyticus</i>	3	0,6
<i>M. flavus</i>	1	0,2
<i>Staphylococcus</i> spp.	287	54,0
<i>S. haemolyticus</i>	55	10,3
<i>S. saprophyticus</i>	48	9,0
<i>S. hominis</i>	46	8,6
<i>S. epidermidis</i>	43	8,3
<i>S. capitis</i>	29	5,4
<i>S. warneri</i>	28	5,2
<i>S. cohnii</i>	16	3,0
<i>S. arlettae</i>	7	1,3
<i>S. caprae</i>	5	0,9
<i>S. lugdunensis</i>	4	0,8
<i>S. pasteurii</i>	3	0,6
<i>S. succinus</i>	1	0,2
<i>S. aureus</i>	1	0,2
<i>S. nepalensis</i>	1	0,2
Outros	59	11,0
CGP totais	532	100,0

5.4.2 GRUPO DOS BACILOS GRAM-POSITIVOS (BGP)

O segundo maior grupo encontrado foi submetido à identificação quanto às espécies em iguais condições e finalidade pretendida para o grupo anterior. As Tabelas 7 (maio) e 8 (junho) demonstram a distribuição das identificações totais de BGP entre os microrganismos mais recorrentes ao longo das áreas em que o grupo foi detectado. A área A1, assim como anteriormente evidenciado, foi a única a não apresentar qualquer identificação de BGP em ambos os meses.

Observou-se que do total das identificações de A2 no primeiro mês (n=27), 74,0% foi do gênero *Bacillus* spp., sendo as espécies *Bacillus infantis* (22,2%), *Bacillus halosaccharovorans* (14,8%) e *Bacillus circulans* (11,1%) as mais frequentes, e as espécies *Bacillus megaterium*, *Bacillus oceanisediminis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus muralis* foram encontradas em 7,4% das amostras cada. No que diz respeito ao gênero *Paenibacillus* spp., as 4 espécies foram identificadas em 14,8% das amostras cada.

Apesar de um menor quantitativo de identificações totais no segundo mês (n=21), uma parcela significativa novamente foi dedicada para *Bacillus* spp. (62,0%), com uma diversidade maior de espécies, como *Bacillus cereus* (14,3%), *Bacillus sralis* e *B. oceanisediminis* (9,5% cada), enquanto para cada uma das 6 espécies restantes houve correspondência de apenas 4,7% do total. No caso de *Paenibacillus* spp., observou-se a distribuição de iguais parcelas de 4,7% entre as três espécies encontradas.

A área A3 apresentou em ambos os meses o mesmo número total de espécies identificadas. Em maio, uma das três identificações foi de *Brevibacterium casei*, enquanto em junho, uma foi referente a *B. cereus* e a outra a *Paenibacillus provencensis*.

No que diz respeito à A4, no mês de maio, percentuais iguais de 33,3% foram detectados para *Bacillus* spp. (*Bacillus mojavensis* e *Bacillus thioparans*) e *Brevibacterium* spp. (*B. Casei*). O mês de junho, por sua vez, apresentou uma quantidade maior de BGP totais (n=15), com 46,6% dedicados ao gênero *Corynebacterium* spp., no qual a espécie *C. pseudodiphtheriticum* apresentou duas identificações, e outras 5 espécies foram identificadas uma única vez. Quanto aos gêneros *Brevibacterium* spp. e *Bacillus* spp., identificou-se três e duas espécies, respectivamente.

Abordando-se A5, o primeiro mês abrigou uma única identificação de *Corynebacterium aurimucosum*. No entanto, o segundo apresentou oito identificações a mais, com 55,5% referentes à *Brevibacterium* spp., onde a maior parte foi de *B. casei* (44,4%). *B. megaterium* e *C. aurimucosum* foram identificados apenas uma vez.

Para A6, não foram identificadas amostras de BGP no mês de maio. Em contrapartida, das duas identificações totais no mês de junho, uma foi referente à espécie *Brevibacterium pityocampae*, não detectada nas situações anteriores.

A sétima e última área apresentou no primeiro mês 24 BGP totais, dos quais 37,5% foi referente ao gênero *Corynebacterium* spp., *C.minutissimum* (12,5%), *C.lipophiloflavum* e *C.amycolatum* (22,2%). Outras duas espécies representaram 11,1% do total. Para *Bacillus* spp. (33,3%), 16,6% foi identificado como *B. oceanisediminis*, além de outras quatro espécies com iguais parcelas de 4,1%. Apenas uma identificação foi encontrada de *Paenibacillus urinalis*.

O segundo mês, por sua vez, teve um total de 19 amostras, das quais a maior parte foi referente a *Bacillus* spp. (37,0%), com 10,5% para *B. infantis* e *B. halosaccharovorans*, e menores parcelas de 5,2% para outras três espécies. *Paenibacillus* spp. foi o segundo gênero mais identificado com *P. provencensis* (21,0%), *B. casei* (10,5%) e *C. minutissimum* (5,2%).

Do total de identificações referentes ao grupo dos BGP (n=130), as espécies com mais ocorrência foram *B. casei* (7,7%), *B. infantis* e *B. oceanisediminis*, ambas com 6,9% e *B. megaterium*, *B. halosaccharovorans* e *P. provencensis* com um total de 5,4%. Outras espécies de BGP identificadas em menor frequência, não pertencentes aos quatro principais gêneros supracitados, resultaram um somatório de 30 (23,3%) amostras.

Tabela 7 – Identificação quanto à espécie das amostras do grupo de BGP de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas no mês de maio.

Número de BGP identificados nas áreas ao longo dos dois meses								
Mês	Microrganismos	Áreas						
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Maio	Bacillus spp.	-	20	-	2	-	-	8
	<i>B. infantis</i>	-	6	-	-	-	-	-
	<i>B. halosaccharovorans</i>	-	4	-	-	-	-	-
	<i>B. circulans</i>	-	3	-	-	-	-	1
	<i>B. megaterium</i>	-	2	-	-	-	-	1
	<i>B. oceanisediminis</i>	-	2	-	-	-	-	4
	<i>B. pumilus</i>	-	2	-	-	-	-	-
	<i>B. muralis</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. sibiralis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. galliciensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. mojavensis</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>B. thioparans</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>B. simplex</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>B. massiliosenegalensis</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Corynebacterium spp.	-	-	-	-	1	-	9
	<i>C. afermentans</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. glaucum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lipophiloflavum</i>	-	-	-	-	-	-	2
	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. amycolatum</i>	-	-	-	-	-	-	2
	<i>C. minutissimum</i>	-	-	-	-	-	-	3
	<i>C. aurimucosum</i>	-	-	-	-	1	-	1
	<i>C. simulans</i>	-	-	-	-	-	-	1
	Paenibacillus spp.	-	4	-	-	-	-	1
	<i>P. urinalis</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>P. illinoisensis</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>P. provencensis</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>P. barengoltzii</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>P. glucanolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	1	-	-	-	-	-
Brevibacterium spp.	-	-	1	2	-	-	-	
<i>B. casei</i>	-	-	1	2	-	-	-	
<i>B. ptyocampae</i>	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. luteolum</i>	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. celere</i>	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. ptyocampae</i>	-	-	-	-	-	-	-	
Outros	-	3	2	2	-	-	6	
BGP totais	0	27	3	6	1	0	24	

Tabela 8 – Identificação quanto à espécie das amostras do grupo de BGP de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas no mês de junho.

Número de BGP identificados nas áreas ao longo dos dois meses								
Mês	Microrganismos	Áreas						
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Junho	Bacillus spp.	-	13	1	2	1	-	7
	<i>B. infantis</i>	-	1	-	-	-	-	2
	<i>B. halosaccharovorans</i>	-	1	-	-	-	-	2
	<i>B. circulans</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>B. megaterium</i>	-	1	-	1	1	-	1
	<i>B. oceanisediminis</i>	-	2	-	1	-	-	-
	<i>B. pumilus</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. muralis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	-	3	1	-	-	-	-
	<i>B. sibiralis</i>	-	2	-	-	-	-	-
	<i>B. subtilis</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>B. galliciensis</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>B. mojavensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. thioparans</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. simplex</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. massiliosenegalensis</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-	1
	Corynebacterium spp.	-	-	-	7	1	-	1
	<i>C. afermentans</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>C. glaucum</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>C. lipophiloflavum</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-	2	-	-	-
	<i>C. amycolatum</i>	-	-	-	1	-	-	-
	<i>C. minutissimum</i>	-	-	-	1	-	-	1
	<i>C. aurimucosum</i>	-	-	-	-	1	-	-
	<i>C. simulans</i>	-	-	-	-	-	-	-
	Paenibacillus spp.	-	3	1	-	-	-	4
	<i>P. urinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. illinoisensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. provencensis</i>	-	1	1	-	-	-	4
	<i>P. barengoltzii</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. glucanolyticus</i>	-	1	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus sp.</i>	-	1	-	-	-	-	-
Brevibacterium spp.	-	-	-	3	5	1	2	
<i>B. casei</i>	-	-	-	1	4	-	2	
<i>B. ptyocampae</i>	-	-	-	1	-	-	-	
<i>B. luteolum</i>	-	-	-	1	-	-	-	
<i>B. celere</i>	-	-	-	-	1	-	-	
<i>B. ptyocampae</i>	-	-	-	-	-	1	-	
Outros	-	5	1	3	2	1	5	
BGP totais	0	21	3	15	9	2	19	

5.4.3 GRUPO DOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS (BGN)

O terceiro grupo de microrganismos (BGN), encontrado com menor frequência em comparação aos dois anteriores, foi identificado quanto às espécies. Apesar de totalizar 35 identificações (maio e junho), algumas espécies de BGN se destacaram por representarem maiores parcelas das amostras totais de cada mês (Tabela 9).

Assim sendo, observou-se que das duas identificações totais em maio na A1, uma foi correspondente à espécie *Brevundimonas vesiculares*. Por outro lado, o mês de junho não apresentou qualquer identificação de BGN.

Com relação à A2, no primeiro mês obteve-se uma identificação de *B. vesiculares* e de *Moraxella osloensis*. Enquanto no segundo, *M. osloensis* se fez presente na mesma quantidade, juntamente com *Pseudomonas stutzeri*.

Na terceira área, para ambos os meses, as identificações dentre os principais gêneros foram apenas de *Pseudomonas* spp., com uma de *P. stutzeri* em maio e uma de *Pseudomonas oryzihabitans* em junho.

No que diz respeito à A4, das 5 identificações totais em maio, uma correspondeu à espécie *P. stutzeri*, duas para o gênero *Brevundimonas* spp. (*B. vesiculares* e *Brevundimonas diminuta*), e uma de *M. osloensis*. Em junho, igualmente com 5 BGN totais, duas identificações foram de *P. stutzeri* e uma de *Pseudomonas mendocina*.

A quinta área analisada apresentou em maio três identificações totais, as quais foram todas referentes à espécie *P. stutzeri*. Em contrapartida do visto anteriormente, em junho não houve qualquer identificação dos principais gêneros.

Para A6, no mês de maio, não foram identificados microrganismos pertencentes ao grupo dos BGN. Entretanto, no mês seguinte, a única identificação encontrada foi de *P. stutzeri*.

A sétima e última área reservou um total de 3 identificações no primeiro mês, as quais foram igualmente divididas entre *Pseudomonas putida*, *B. diminuta* e *M. osloensis*. No segundo mês, totalizando 5 BGN totais, três se distribuíram em *Brevundimonas* spp. e apenas uma foi correspondente de *M. osloensis*.

Do total de identificações referentes ao grupo em questão, a espécie mais frequente foi *P. stutzeri* (25,7%), seguida de *M. osloensis* (14,3%), enquanto *B. vesiculares* e *B. diminuta* tiveram a mesma frequência (8,6%).

Tabela 9 – Identificação quanto à espécie das amostras do grupo de BGN de bactérias aeróbias mesófilas do ar recuperadas nas culturas das salas ao longo dos dois meses de amostragem.

Número de BGN identificados nas áreas ao longo dos dois meses								
Mês	Microrganismos	Áreas						
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Maio	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	1	1	3	-	1
	<i>P. stutzeri</i>	-	-	1	1	3	-	-
	<i>P. putida</i>	-	-	-	-	-	-	1
	<i>P. oryzihabitans</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mendocina</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Brevundimonas</i> spp.	1	1	-	2	-	-	1
	<i>B. vesicularis</i>	1	1	-	1	-	-	-
	<i>B. diminuta</i>	-	-	-	1	-	-	1
	<i>B. albigilva</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Brevundimonas</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Moraxella</i> spp.	-	1	-	1	-	-	1
	<i>M. osloensis</i>	-	1	-	1	-	-	1
	Outros	1	1	1	1	-	-	-
	BGN totais	2	3	2	5	3	0	3
	Junho	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	1	1	3	-	1
<i>P. stutzeri</i>		-	1	-	2	-	1	-
<i>P. putida</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oryzihabitans</i>		-	-	1	-	-	-	-
<i>P. mendocina</i>		-	-	-	1	-	-	-
<i>Brevundimonas</i> spp.		-	-	-	-	-	-	3
<i>B. vesicularis</i>		-	-	-	-	-	-	-
<i>B. diminuta</i>		-	-	-	-	-	-	1
<i>B. albigilva</i>		-	-	-	-	-	-	1
<i>Brevundimonas</i> sp.		-	-	-	-	-	-	1
<i>Moraxella</i> spp.		-	1	-	-	-	-	1
<i>M. osloensis</i>		-	1	-	-	-	-	1
Outros		-	2	-	2	1	-	1
BGN totais		0	4	1	5	1	1	5

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no estudo desenvolvido revelaram que, apesar das diferenças encontradas de uma área para a outra em relação ao somatório das UFCs dos pontos de amostragem, os microrganismos se fizeram presentes em todas elas ao longo dos dois meses de amostragem. Tais evidências indicam a importância de se realizar esse tipo de avaliação nas áreas que tenham relação com a produção em uma indústria farmacêutica, pois os microrganismos são capazes de habitar uma enormidade de habitats nas mais variadas condições, apresentando uma capacidade adaptativa extraordinária, desde que os parâmetros físico-químicos e nutricionais estabeleçam o mínimo necessário para a sua existência (Nicolau, 2016).

A partir dos dados encontrados nas áreas onde as duas diferentes metodologias de amostragem foram empregadas, foi possível observar que a amostragem de ar por sedimentação apresentou um número maior de UFCs isoladas quando comparada com os resultados obtidos para a amostragem de ar ativo, em ambos os meses estudados. Porém, não é possível afirmar que uma metodologia seja mais eficiente em relação à outra na recuperação de microrganismos do ar. Isto é, a exposição das placas no ambiente pela técnica de sedimentação pelo período de 4h pode ter promovido um maior acompanhamento das atividades e fluxo de ar nas áreas analisadas, possibilitando a captação de uma quantidade maior de partículas presentes no ambiente e, conseqüentemente, no isolamento de mais microrganismos. Por outro lado, a utilização de equipamento amostrador de ar por um curto período de 10 minutos, apesar de um grande volume de ar filtrado, pode ter expressado apenas um momento desta seqüência de movimentação da área, e por isso, tenha mostrado um quantitativo menor de partículas aspiradas. Ademais, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed. (2019), a técnica escolhida pode exercer uma influência considerável na quantidade de microrganismos recuperados do ar. Ainda que seja uma das mais utilizadas para tal finalidade, a amostragem passiva (por sedimentação), não é considerada ideal para uma avaliação quantitativa precisa, ao passo que para a amostragem ativa, a utilização de equipamentos amostradores de ar é limitada com relação ao volume de ar testado, o que pode reduzir a precisão dos resultados obtidos (Brasil, 2019).

Os microrganismos isolados durante as amostragens foram identificados através da técnica de MALDI-TOF, a qual se baseia na detecção de proteínas (especialmente proteínas ribossômicas), produzindo diferentes espectros, os quais foram processados e comparados àqueles de microrganismos conhecidos e existentes no banco de dados, gerando os resultados com base no nível de complementaridade dos espectros (Melo, 2014). Um ponto fraco desta

técnica, relacionado à composição do banco de dados, é a presença de um número limitado de espécies representativas da área ambiental, o que pode explicar o fato de encontrarmos resultados denominados como “identificação não confiável”. Apesar da técnica de espectrometria de massas apresentar um grande potencial de aplicação para tal finalidade, as espécies de procariotos existentes nos bancos de dados são consideravelmente pequenas, frente à quantidade de espécies ainda desconhecidas. Assim, a probabilidade de um isolado ambiental representar uma espécie ainda não caracterizada é alta, no que diz respeito a sua existência nos bancos de dados atualmente utilizados (Welker e Moore, 2010).

O aparecimento de leveduras nas análises de identificação, apesar de não se enquadrarem como alvo do estudo em questão, justifica-se pela sua presença em diversos ambientes e no fato da metodologia do MALDI-TOF possibilitar a detecção de espécies de leveduras sem a necessidade de etapas mais específicas, como a etapa de extração proteica quando da análise de fungos filamentosos, seguindo a mesma abordagem da identificação empregada para espécies bacterianas (van Veen, Claas e Kuijper, 2010).

Os resultados revelaram que a maioria das bactérias isoladas pertenciam ao grupo CGP, resultado esse esperado pela maior resistência ao estresse ambiental entre as bactérias gram-positivas. A origem desses microrganismos é uma questão em aberto e levantam a hipótese de um carreamento significativo de microrganismos através de operadores, os quais são classificados como uma das principais fontes de contaminação de salas limpas. Sobre o segundo grupo detectado em maior quantidade, BGP podem ter sido provenientes do arraste de superfícies secas, enquanto que a presença de BGN é associada com a proliferação onde há o acúmulo de água e resíduos de produtos (Sena, 2014; Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

No que diz respeito às diferenças expressas na quantificação de bactérias detectadas em cada sala, pode-se dizer que um dos principais fatores que influenciam na obtenção desses resultados é a classificação na qual os ambientes são enquadrados. Isto é, as salas determinadas como grau A são ditas zonas de alto risco operacional, onde o produto é mais suscetível à contaminação e a tolerância microbiológica é mais baixa (área de envase, cravação, cabines de fluxo laminar, etc.). As áreas grau B auxiliam na proteção de áreas grau A circundando-as, enquanto as áreas de grau C e D são descritas, respectivamente, como locais de baixo risco operacional (Andrade, 2017). Assim, as ações de inibição de contaminação tendem a seguir o nível de criticidade de cada área (higienização, tipo e utilização de EPIs, fluxo de operadores, estrutura e entorno das áreas classificadas, etc.), para fins de manter as condições microbiológicas dentro do limite aceitável estabelecido, o que reflete na quantidade de partículas viáveis captadas em cada caso.

Os gêneros *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. apresentaram uma maior ocorrência dentre os demais CGP. Do total das amostras deste grupo, a maioria se enquadrou na espécie *M. luteus*. Essa espécie é classificada como um microrganismo comensal da pele humana e do trato respiratório superior, características que podem associar a sua presença em ambientes diversos através do descama da pele e da respiração (Gupta *et al.*, 2019).

Com relação ao gênero *Staphylococcus* spp., quatro espécies igualmente associadas à pele humana destacaram-se dentre as demais pela frequência de identificações. Em primeiro, *S. haemolyticus* é caracterizada por ser um membro dos *Staphylococcus* coagulase negativo (CoNS), e um conhecido patógeno oportunista com perfil de multirresistência a drogas, sendo comumente encontrado em regiões mais específicas, como virilha, períneo e axila (Daniel, Saleem e Fida, 2014).

A espécie *S. saprophyticus*, por sua vez, é descrita pela sua capacidade de colonizar áreas como o trato gastrointestinal, uretra, períneo e o reto, estando bastante relacionada com o desenvolvimento de infecções do trato urinário (Ehlers e Merrill, 2018). As outras duas espécies identificadas com maior frequência foram *S. hominis* e *S. epidermidis*. Ambas também fazem parte do grupo CoNS, sendo a primeira encontrada comumente em indivíduos saudáveis, isoladas de regiões como a axila, por exemplo. A segunda é apontada como sendo a espécie isolada com maior frequência na pele e em várias mucosas como a nasal, responsável por proteger a pele promovendo uma ação contra potenciais patógenos por meio da liberação de substâncias de caráter antibacteriano, entre outros mecanismos (Alonzo, 2022).

Em relação aos grupos BGP e BGN, identificados com menor frequência quanto ao total de identificações válidas, a espécie em maior número dentre os BGP foi *B. casei*. De acordo com um estudo, o gênero *Brevibacterium* spp. é conhecido por 7 principais espécies bacterianas aeróbias obrigatórias, as quais podem ser encontradas facilmente em produtos de origem láctea, além da superfície da pele humana. Acredita-se que esses microrganismos contribuem para o odor corporal (Janda, Tipirneni e Novak, 2003). Para o grupo dos BGN observou-se que *P. stutzeri* foi identificada em maior número. A espécie em questão é descrita na literatura por ser amplamente dispersa pelo ambiente, sendo capaz de habitar os mais variados nichos ecológicos, tais como água e solo contaminado, sedimentos marinhos e a rizosfera, além do isolamento a partir de amostras clínicas, sendo descrita como um patógeno humano oportunista (Lalucat *et al.*, 2006; Sousa, 2019).

É possível constatar que o perfil microbiano majoritário encontrado neste estudo está de acordo com outros dados da literatura. Segundo os dados levantados por Utescher (2007),

os principais gêneros bacterianos isolados de salas limpas de uma indústria farmacêutica nacional foram *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp., com maior frequência e distribuição deste último. Sandle (2011), por sua vez, além desses três gêneros cita que *Pseudomonas* spp. esteve entre os destaques de microrganismos recuperados de áreas classificadas.

Uma pesquisa desenvolvida visando averiguar a aplicabilidade da tecnologia do MALDI-TOF para o mesmo tipo de isolados ambientais revelou igualmente o aparecimento desses gêneros, destacando-se espécies também vistas neste estudo, tais como *M. luteus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (Andrade, 2017). A exceção foi o gênero *Brevibacterium* spp., não mencionado nas referências supracitadas, porém descrito ser isolado pela técnica de amostragem de ar passiva de um ambiente farmacêutico (Park *et al.*, 2013).

Em suma, com base nas descrições da literatura acerca dos microrganismos encontrados, pode-se dizer que as espécies identificadas em maior quantidade nos três grupos, provenientes da amostragem de ambientes classificados, apresentam uma tendência de associação com a origem humana, em virtude de serem alguns dos principais constituintes da microbiota da pele, e de ampla dispersão pelo ambiente. Nesse contexto, a presença das espécies nesses ambientes com baixa tolerância para microrganismos pode indicar não só práticas de higienização pessoal e utilização de EPIs fora da conformidade, mas também a entrada de contaminação de ambientes externos, o que reforça a necessidade de maiores instruções e treinamento de colaboradores quanto às Boas Práticas de Fabricação.

Por outro lado, a utilização de saneantes e esterilizantes em áreas críticas da indústria como aquelas diretamente relacionadas com a fabricação de produtos estéreis, requer um monitoramento quantitativo e qualitativo constantes, os quais necessariamente devem levar em conta a microbiota desses locais. Isso é necessário inclusive para orientar a implementação do rodízio dos saneantes nas diversas áreas que integram a zona de produção da fábrica.

Assim, a realização de uma avaliação das condições microbiológicas pelo programa de monitoramento ambiental é necessária para a manutenção das conformidades sinalizadas pelas Boas Práticas de Fabricação. Entretanto, a forma como cada indústria irá realizá-la pode ser moldada e direcionada de acordo com as suas demandas e condições de atuação, mediante processos e estudos de validação.

Desta forma, a pesquisa mais acurada dos aspectos envolvendo parâmetros de amostragem, prevalência total de microrganismos em cada área, colonização e diferenças nas características de microrganismos captados de acordo com a técnica de amostragem empregada é de grande importância para que a qualidade dos dados obtidos seja a mais

acurada possível. Assim, as amostragens ambientais devem ser adequadas e adaptadas para as necessidades da empresa e do tipo de produto a ser produzido. Logicamente, toda a cadeia produtiva, envolvendo todos os setores relacionados tem que estar comprometidos. Assim, a metodologia de amostragem tem uma importância fundamental e exige uma padronização e avaliação constante, relacionada com a qualidade do produto final. Para isso, o tempo e volume de captação do ar na técnica de ar ativo (uso de amostradores de ar) e a análise de diferentes pontos de amostragem têm grande importância. Por outro lado, a técnica de exposição das placas da metodologia de sedimentação espontânea tem sua validade indicativa da carga microbiana, mas não permite um referencial seguro da quantificação para efeitos de comparação e pode sofrer uma variabilidade grande de acordo com o dia de realização .

Nosso estudo foi desenhado para a amostragem somente nos meses de maio e junho, mas, seguramente, uma avaliação durante vários meses em diferentes estações do ano, pode trazer informações importantes quanto a variabilidade tanto qualitativa como quantitativa da carga microbiana.

Finalmente, apesar de não ter sido o foco deste estudo, é de fundamental importância a detecção de possíveis fontes de contaminação ambiental nessas áreas classificadas. Para isso, como foi observado, muitos contaminantes detectados têm sua origem nas mucosas humanas, o que requer a implementação de um treinamento constante dos colaboradores para, através da educação contínua, motivá-los a aderir aos cuidados higiênicos e de utilização dos EPIs de forma correta e contínua, evitando assim a possível contaminação ambiental.

Assim, este estudo demonstrou a importância da determinação da contaminação ambiental em uma área sensível de uma indústria farmacêutica, utilizando-se técnicas padrão recomendadas pela legislação e técnicas sensíveis para identificação rápida e precisa das espécies microbianas, possibilitando, assim, que medidas de controle adequadas possam ser implementadas, quando desvios importantes forem detectados.

7 CONCLUSÕES

- As técnicas de monitoramento ambiental empregadas neste estudo permitiram determinar a carga microbiana de 7 áreas escolhidas em uma indústria farmacêutica;
- A amostragem de ar passiva, através de exposição das placas contendo meio de cultura, por 4h, foi mais efetiva que a técnica de ar ativo (através de amostrador de ar) por 10 min;
- A identificação pela metodologia do MALDI-TOF de microrganismos isolados do ar de salas limpas e outros ambientes controlados apresentou uma performance e aplicabilidade satisfatória para a finalidade pretendida;
- Uma relação de rastreabilidade de grupos bacterianos, ao correlacionar-se os dados do monitoramento ambiental com os resultados das identificações do MALDI-TOF, revelou uma maior frequência e distribuição de microrganismos classificados como CGP, em comparação aos grupos BGP e BGN;
- Dentre os CGP, os principais gêneros encontrados foram *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.;
- Dentre os BGP e BGN, os principais gêneros encontrados foram *Brevibacterium* spp. e *Pseudomonas* spp., respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (2015). Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO 9001:2015: sistemas de gestão da qualidade: requisitos. Rio de Janeiro, 32p.

Alonzo, F. (2022). Toward Uncovering the Complexities of Bacterial Interspecies Communication and Competition on the Skin. *mBio*, 13, e00930-22.

Andrade, O. L. (2017). Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na tecnologia MALDI-TOF. Dissertação (Mestre em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 143p.

Araújo, E. B., Lavinas, T., Colturato, M. T., Mengatti, J. (2008). Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(1), pp. 1-12.

Barbosa, T. D; Trigo, A. C.; Santana; L. C. (2015). Qualidade no atendimento como fator de crescimento empresarial. *Revista de Iniciação Científica – RIC*, 2(2), pp. 112-133.

Belart, M. S. V. C. (2009). Gerenciamento de riscos à qualidade aplicado à gestão de materiais: uma proposta para implementação em bio-manguinhos. Dissertação (Especialista em Gestão Industrial de Imunobiológicos) - Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 53f.

Borin, I. C., Martins, V., Taketani, N. F. (2022). A implementação de métodos rápidos microbiológicos na indústria farmacêutica. *Revista Ensaio Pioneiros*, 5(2), pp. 20-34.

Brasil (2019a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 02/05/2022.

Brasil (2019b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa - IN No 35, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Estéreis. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-35-de-21-de-agosto-de-2019-211914062>. Acesso em: 04/05/2022.

Brasil (2022). Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 658 de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-658-de-30-de-marco-de-2022-389846242>. Acesso em: 07/05/2022.

Bretondeau, L., Tremblais, K., Aubrit, F., Meichenin, M., Arnaud, I. (2020). Good Manufacturing Practice (GMP) Compliance for Phage Therapy Medicinal Products. *Frontiers in Microbiology*, 11:1161.

Cater, D., Pasqualone, R. G. (1993). ISO 9000 – A perspective on a global quality standard. *Industry Applications Society 40th Annual Petroleum and Chemical Industry Conference, IEEE*, pp. 241-249.

Charoo, N. A., Ali, A. A. (2013). Quality risk management in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylor & Francis Group, 39(7), pp. 947–960.

Cubas, M. R., Denipote, A. G. M., Malucelli, A., Nóbrega, M. M. L. (2010). A norma ISO 18.104:2003 como modelo integrador de terminologias de enfermagem. *Revista Latino- Americana de Enfermagem*, 18(4), pp. 669-674.

Crosby. P.B. *Quality is Free*. New York: New American Library, 1979.

Dalolio, L., Raggi, A., Sanna, T., Mazzetti, M., Orsi, A., Zanni, A., Farrugia, P., Leoni, E. (2017). Surveillance of Environmental and Procedural Measures of Infection Control in the Operating Theatre Setting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 46.

- Damaso, G., Denoya, C., Quelle, D. (2016). Controle Microbiano e Monitoramento em Salas Limpas de Processamento Asséptico. Particle Measuring Systems. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, pp. 38-45.
- Daniel, B., Saleem, M., Naseer, G., Fida, A. (2014). Significance of *Staphylococcus Haemolyticus* in Hospital Acquired Infections. *Journal of Pioneering Medical Sciences*, 4(3), pp. 119-125.
- Denyer, S. P., Baird, R. M. (2006). *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. 2. ed. (Boca Raton: CRC Press), 504p.
- Ehlers, S., Merrill, S. A. (2018). *Staphylococcus Saprophyticus*. StatPearls Publishing. PMID: 29493989. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/29493989#_article-29454_s14_.
- Eudralex (2008). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Volume 4. Annex 1 - Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version). Disponível em: <https://health.ec.europa.eu>. Acesso em: 19/09/2022.
- Eudralex (2013). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Volume 4. Part 1 – Basic Requirements for Medicinal Products. Chapter 1: Pharmaceutical Quality System. Disponível em: <https://health.ec.europa.eu>. Acesso em: 28/09/2022.
- Eudralex (2014). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Volume 4. Part 1 – Basic Requirements for Medicinal Products. Chapter 5: Production. Disponível em: <https://health.ec.europa.eu>. Acesso em: 27/09/2022.
- FDA (2004). Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice. Disponível em: <https://www.fda.gov>. Acesso em: 24/09/2022.
- Gordon, O., Berchtold, M., Staerk, A. (2014). Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 68(5), pp. 394-406.
- Gouveia, B. G., Rijo, P., Gonçalo, T, S., Reis, C. P. (2015). Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(2), pp. 87–96.
- Gupta, V., Chauhan, A., Kumar, R. N. S., Dhyani, A., Chakravarty, S. (2019). Meningitis caused by *Micrococcus luteus*: Case report and review of literature. *International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases*, 5(1), pp. 63-64.
- ICH (2005). ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. ICH Q9 - Quality Risk Management. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 26/09/2022.
- ICH (2008). ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. ICH Q10 - Sistema de Qualidade Farmacêutica. Disponível em: <https://www.gov.br>. Acesso em: 28/09/2022.
- Janda, W. M., Tipirneni, P., Novak, R. M. (2003). *Brevibacterium casei* Bacteremia and Line Sepsis in a Patient with AIDS. *The Journal of infection*, 46 (1), pp. 61-64.
- JP (2011). Japanese Pharmacopoeia XIV (English Edition): General Information: Microbiological Evaluation of Processing Areas for Sterile Pharmaceutical Products. Disponível em: <https://jpdb.nihs.go.jp/jp14e/contents.html>.
- Lalucat, J., Bennisar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70 (2), pp. 510-547.

Levi, L., Walker, G. C., Pugsley, L. I. (1964). Quality Control of Pharmaceuticals. Canadian Medical Association Journal, 91(15), pp. 781–785.

Ludwig, F. P., Silva, I. (2020). Requisitos de área limpa para produção de medicamentos injetáveis na indústria farmacêutica. Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz.
Disponível em: https://oswaldocruz.br/revista_academica/content/pdf/Edicao25_Fernanda_Perez_Ludwig.pdf

Mello, C. N. (2020). Produção de toxinas por *Staphylococcus* sp. Isoladas de amostras de pele: uma revisão bibliográfica. Monografia (Bacharel em Biomedicina). Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 34f.

Melo, L. V. (2014). A utilização da espectrometria de massa MALDI-TOF na identificação de microrganismos no controle de qualidade farmacêutico. Monografia (Especialista em Microbiologia Industrial e Ambiental) – Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 41f.

Mitra, A. (2016). Fundamentals of Quality Control and Improvement. 4. ed. (Nova Jersey, John Wiley & Sons), pp. 3-46.

Nicolau, P. B. (2016). Microrganismo e ambiente: Ar e água, solo e extremos. Universidade Aberta. Disponível em: <https://repositorioaberto.uab.pt/handle/10400.2/6135>. Acesso em: 15/10/2022.

Heires, M. (2008). The International Organization for Standardization (ISO), New Political Economy, 13(3), pp. 357-367.

Huynh-ba, K., Sassi, A. (2018). ANVISA: an introduction to a new regulatory agency with many challenges. AAPS Open, 4(9).

Park, H. K., Han, J. -H., Joung, Y., Cho, S. -H., Kim, S. -A., Kim, S. B. (2013). Bacterial diversity in the indoor air of pharmaceutical environment. Journal of Applied Microbiology, 116(3), pp. 718-727.

PDA (2001). Parental Drug Association. Technical Report nº 13. Fundamentals of an Environmental Monitoring Program. Disponível em: www.pda.org/bookstore. Acesso em: 27/09/2022.

PDA (2013). Parental Drug Association. Technical Report nº 33. Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods. Disponível em: www.pda.org/bookstore. Acesso em: 20/09/2022.

Pereira, T. M. C. B. (2011). O controle de qualidade microbiológico na sala de produção de uma indústria. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 47p.

PIC/S (2014). Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspections Co-operation Scheme. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (PE 009- 11).
Disponível em: <http://www.picscheme.org>. Acesso em: 27/09/2022.

Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M., Pinto, A. F. (2015). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 4. ed. (São Paulo: Atheneu Editora), pp. 1 - 238.

Rocha, T. G., Galende, S. B. (2014). A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. Revista UNINGÁ, Master editora, 20(2), pp. 97-103.

Sandle, T. (2011). A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 65(4), pp. 392-403.

Sandle, T. (2016). Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control. (Cambridge: Woodhead Publishing), pp. 1-45.

Schicht (1985). Clean room technology: the concept of total environmental control for advanced industries. Vacuum, 35(10), pp. 485-491.

Sena, C. M. S. (2014). Estudo do perfil microbiológico da seção de envasamento e acondicionamento de soros e vacinas desenvolvidos no Instituto Butantan. Monografia (Programa de Aprimoramento Profissional – PAP – SES-SP). Instituto Butantan, São Paulo, 68p.

Silva, V. L., Ferreira V. D., Pereira, T. R., Batista, S. T., Alencar, M. B., Silva, M. M., Sousa, J. L. S., Ribeiro, J. V.S, Ibiapina, J. O. O. (2018). Gestão da Qualidade: Conceitos e Perspectivas em Segurança nos Serviços de Saúde Pública. *Semana Acadêmica*, 128, 1-23.

Sousa, L. P. (2019). Mobile Genetic Elements in *Pseudomonas stutzeri*. *Current Microbiology*, 77 (1), pp. 179-184.

Souza, J. C. (2019). Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos Estéreis. Monografia (Especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica) - Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 48f.

Sutton, S. (2010). The environmental monitoring program in a GMP environment. *Journal of GXP Compliance*, 14(3), pp. 22-30.

Tsung-yun, H., Chuan, N., Shih-hua, T. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of food and drug analysis*, 27(2), pp. 404-414.

USP (2013). <1116> Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments. *United States Pharmacopeia 36—National Formulary 31*.

Disponível em: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99835_01_01.html.

Utescher, C. L. A., Franzolin, M. R., Trabuasi, L. R., Gambale, V. (2007). Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), pp. 710-716.

van Veen, S. Q., Claas, E. C. J., Kuijper, E. J. (2010). High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), pp. 900-907.

Welker, M., Moore, E. R. B. (2010). Applications of whole-cell matrix-assisted laser- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(1), pp. 2-11.

Whyte, W., Eaton, T. (2004). Microbiological contamination models for use in risk assessment during pharmaceutical production. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*, 9(1), pp. 11-15.

Xavier, M. P., Nogueira, H. S., Xavier, M. A. S., Xavier, A. R. E. O. (2017). Monitoramento microbiológico de áreas grau A e B de uma produção asséptica. *Revista Unimontes Científica*, 19(2), pp. 112-125.