

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA E ESTATÍSTICA APLICADA AO
MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PRODUTIVAS
FARMACÊUTICAS**

Adriana Cogo Malgueiro Lírio

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011.

Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Professora Doutora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L768a Lírio, Adriana Cogo Malgueiro
Abordagem microbiológica e estatística aplicada ao monitoramento ambiental em áreas produtivas farmacêuticas / Adriana Cogo Malgueiro Lírio. - São Paulo, 2018.
132 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Monitoramento microbiológico ambiental. 2. áreas produtivas não-estéreis. 3. distribuição estatística. 4. controle de processos. 5. microbiota ambiental. I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

Adriana Cogo Malueiro Lírio

ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA E ESTATÍSTICA APLICADA AO
MONITORAMENTO AMBIENTAL EM ÁREAS PRODUTIVAS
FARMACÊUTICAS

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____.

LÍRIO, A.C.M. **Abordagem microbiológica e estatística aplicada ao monitoramento ambiental em áreas produtivas farmacêuticas.** 2018. 132p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

O controle microbiológico durante a produção de preparações farmacêuticas é de grande importância para garantir a qualidade do produto final, quanto às propriedades terapêuticas e de segurança ao paciente. O monitoramento ambiental é uma valiosa ferramenta como forma de mensurar a efetividade das medidas que integram a estratégia de controle de contaminação microbiana. Neste contexto, pouco destaque tem sido dado à manufatura de produtos farmacêuticos não-estéreis, por representarem as classes cujos riscos de contaminação microbiana são menores, quando comparados aos produtos parenterais. Dessa maneira, este estudo teve como objetivo caracterizar os isolados microbianos de amostras de ar ativo e passivo e de superfícies de áreas produtivas não-estéreis. Ainda, visou-se avaliar estatisticamente os dados de monitoramento ambiental, como base para o desenvolvimento de uma abordagem para determinação de limites de alerta e ação. Os resultados obtidos revelaram que a maioria dos microrganismos encontrados são de origem humana, seguidos por bactérias e fungos provenientes do solo. As diferenças sazonais foram observadas, principalmente, para a ocorrência de fungos, mais prevalentes no período seco. Foi desenvolvida uma abordagem estatística baseada em (1) determinação de subgrupos racionais, (2) avaliação da distribuição estatística e (3) determinação de limites, utilizando, como critério, o índice de capacidade do processo (C_{pk}). Um melhor entendimento do perfil microbiano das áreas produtivas e a determinação de limites de acordo com a distribuição real dos dados levará à destinação dos recursos necessários a ações que visem a qualidade do produto e a segurança do paciente.

PALAVRAS-CHAVE: Monitoramento microbiológico ambiental, áreas produtivas não-estéreis, distribuição estatística, controle de processos, microbiota ambiental, recuperação microbiana.

LÍRIO, A.C.M. **Microbiological and Statistical Approach Applied to Environmental Monitoring of Pharmaceutical Manufacturing Areas.** 2018. 132p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

The microbiological control during the production of pharmaceutical preparations is of great importance for quality assurance of the final product regarding to therapeutic properties and patient safety. Environmental monitoring is a valuable tool to measure the effectiveness of the actions that integrate the microbial contamination control strategy. In this context, little attention has been given to the manufacture of non-sterile pharmaceutical products, because they represent classes whose microbial contamination risks are lower when compared to parenteral products. Considering this scenario, this study aimed to characterize microbial isolates from surfaces, active and passive air sampling of non-sterile manufacturing areas. Furthermore, it was expected to statistically evaluate the environmental monitoring data, as a basis for the development of an approach for determining alert and action limits. The results showed that most of the microorganisms found are from human source, followed by bacteria and fungi typically found in the soil. The seasonal differences were mainly observed for fungi recovery, which were more prevalent in the dry period. A statistical approach was developed based on (1) the determination of rational subgroups, (2) evaluation of the statistical distribution and (3) limit determination, using the process capacity index (Cpk) as criteria. A better understanding of the typical manufacturing areas microbial profile and the determination of limits according to the actual data distribution will lead to the allocation of the necessary resources to actions focusing on product quality and patient safety.

KEYWORDS: Microbiological Environmental Monitoring, non-sterile manufacturing areas, statistical distribution, process control, environmental microflora, microbial recovery.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para sua efetivação.

Quero agradecer a Deus pelo dom da vida e por mais esta conquista, fonte de minhas forças e inspiração.

À Professora Dra. Terezinha, exemplo de pessoa e profissional, acima de tudo, pela confiança, amizade e dedicação na orientação deste trabalho, contribuindo com suas experiências e proporcionando oportunidades únicas de desenvolvimento profissional, que foram essenciais para a concretização desta etapa.

Agradeço às minhas gestoras da empresa Eli Lilly, Lilian, Patrícia, Denise, Renata e Andrea, pela confiança, pelo apoio e pela flexibilização, para o cumprimento das etapas deste projeto. Agradeço, também, pelas oportunidades de aperfeiçoamento profissional, em especial, o período de experiência em Porto Rico, que agregaram ricas contribuições técnicas. Não poderia deixar de agradecer os profissionais de Lilly del Caribe, pelo acolhimento e confiança, em especial, Lourdes, Graciela, Jessica, Ileana e Victor, e, também, pelo apoio dado nos momentos mais difíceis após a passagem dos furacões Irma e Maria por Porto Rico.

Aos profissionais das indústrias farmacêuticas parceiras que, prontamente, forneceram-me os dados necessários para este estudo.

A meus pais, que sempre me apoiaram em meus estudos e pelo alicerce, zelo e ensinamentos para a minha formação.

Ao meu esposo, Luccas, quando me ausentei, por motivos de estudo e planejamento, pelos momentos de aconchego e compreensão, pela parceria e suporte durante todo esse período, incluindo os momentos mais difíceis.

Aos professores Felipe, Carlos, Victor e Linda, pela capacitação técnica em estatística, sou grata, pois o conhecimento, uma vez adquirido, jamais poderá ser tirado.

Ao meu querido marido, Luccas e aos meus pais, Luiz Antônio e Walkíria.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

a_w – Atividade de água

BPF ou GMP – Boas Práticas de Fabricação (*Good Manufacturing Practices*)

EuPh – Farmacopeia Europeia (*European Pharmacopeia*)

FB – Farmacopeia Brasileira

FDA – *Food And Drugs Administration*

FMEA – Análise de Tipos e Efeitos de Falha (*Failure Mode and Effect Analysis*)

FTA – Análise de Árvore de Falhas (*Fault Tree Analysis*)

HACCP – Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle (*Hazard Analysis Critical Control Point*)

HVAC – Sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado (*Heating, Ventilation, and Air Conditioning*)

IC – Intervalo de Confiança

ICH – Conferência Internacional em Harmonização (*International Council of Harmonization*)

IntPh - Farmacopeia Internacional (*International Pharmacopeia*)

ISO – Organização Internacional de Normatização (*International Organization for Standardization*)

JP – Farmacopeia Japonesa (*Japanese Pharmacopeia*)

MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Dissorption – Time of Flight*

MS – Espectroscopia de Massas (*Mass Spectroscopy*)

pH – Potencial hidrogeniônico

Prob - Probabilidade

QbD – Qualidade por Design (*Quality by Design*)

QRM – Gerenciamento de Riscos da Qualidade (*Quality Risk Management*)

RODAC® - *Replicated Organisms Detection and Counting*

USP – Farmacopeia Norte-Americana ou Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*)

FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1-1. Total de recolhimentos pelo FDA de 2004 a 2011 por tipo de produto (Adaptado de: SUTTON & JIMENEZ, 2012).....4

Figura 1-2. Total de recolhimentos de produtos não-estéreis pelo FDA de 2004 a 2011 por tipo de causa (Adaptado de: SUTTON & JIMENEZ, 2012).....5

Figura 1-3. Fatores que contribuem para a biocarga de produtos não-estéreis (Adaptado de: UNITED, 2018c).....9

Capítulo 3

Figura 3-1: Esquema ilustrativo com a disposição no formato de planta baixa das salas incluídas neste estudo. As áreas foram divididas entre Almojarifado Químico, Produção e Embalagem.....49

Figura 3-2. Localização dos pontos de amostragem nas cabines de pesagem (CP1, CP2 e CP3). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.....51

Figura 3-3. Localização dos pontos de amostragem na área para granulação (G1, G2 e G3) e mistura de pós (MC). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície. O asterisco indicado na sala MC representa a localização do equipamento móvel utilizado para a classificação de cápsulas por peso, o qual também poderá estar localizado na sala de impressão/classificação (IC).....51

Figura 3-4. Localização dos pontos de amostragem nas salas de compressão (C1 e C2). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.....52

Figura 3-5. Localização dos pontos de amostragem nas salas de revestimento de comprimidos (R1 e R2). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.....52

Figura 3-6. Localização dos pontos de amostragem na área de impressão e classificação (IC). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície. O asterisco representa a localização do equipamento móvel utilizado para a classificação de cápsulas por peso, o qual também poderá estar localizado na sala de mistura/classificação (MC).....53

Figura 3-7. Localização dos pontos de amostragem na área de armazenamento de materiais limpos (ML). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar.....54

Figura 3-8. Localização do ponto de amostragem na sala de lavagem e limpeza dos equipamentos e materiais envolvidos no processo. O ponto identificado em vermelho refere-se à amostragem ativa de ar.....54

Figura 3-9. Localização dos pontos de amostragem na sala de encapsulamento (E). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.....55

Figura 3-10. Localização dos pontos de amostragem nas salas de emblistamento (embalagem primária). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.....55

Figura 3-11. Esquema representativo do processo de produção e embalagem de cápsulas e comprimidos. As setas laranjas indicam o fluxo de matéria prima e produto. As setas vermelhas indicam a movimentação de materiais e equipamentos sujos e as setas azuis, de materiais e equipamentos limpos. Nota: O processo de classificação de cápsulas por peso é realizado em um equipamento móvel, representado pelo asterisco roxo, podendo ser realizado em

ambas as salas MC e IC. Os pontos de amostragem destas salas também contemplam esta operação.....	56
Figura 3-12: Equipamento Air IDEAL 3P ®, BioMérieux, utilizado para a amostragem de ar ativo (Retirado de BIOMÉRIEUX, 2018).....	59
Figura 3-13. Tabela de correção para contagem microbiana de ar ativo viável obtida com a utilização do equipamento Air IDEAL 3P, BioMérieux. (Adaptado de: BIOMÉRIEUX, 2017).....	63
Figura 3-14. Exemplo de placa microbiológica marcada pela impactação do ar durante amostragem ativa.....	67
Figura 3-15. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar ativo durante o período chuvoso (A) e seco (B).....	72
Figura 3-16. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar passivo durante o período chuvoso (A) e seco (B).....	73
Figura 3-17. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de superfície durante o período chuvoso (A) e seco (B)	74
Figura 3-18. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar ativo durante o período chuvoso (A) e seco (B).....	77
Figura 3-19: Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar passivo durante o período chuvoso (A) e seco (B).....	78
Figura 3-20. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de superfície durante o período chuvoso (A) e seco (B).....	79
Capítulo 4	
Figura 4-1. Exemplificação de um gráfico de distribuição normal e a porcentagem da população que se encontra dentro da faixa de variação de 1σ , 2σ , 3σ e 4σ ao redor da média μ , sendo σ o desvio padrão da população (Adaptado de: PORTAL ACTION, 2018).....	87

Figura 4-2. Distribuição de Poisson com o aumento da média (λ) de ocorrências (a) e comparação entre as distribuições normal e de Poisson para $\mu=1$ (normal), $\lambda=1$ (Poisson) e para $\mu=10$ (normal), $\lambda=10$ (Poisson) (Adaptado de: SUN et al., 2006).....	89
Figura 4-3. Esquema ilustrativo da distribuição de partículas em ao longo das diluições seriadas conforme técnica NMP (Adaptado de: SUN et al., 2006).....	91
Figura 4-4. Histograma dos resultados de amostragem de ar ativo para monitoramento ambiental frente às curvas de probabilidade traçadas para os diferentes tipos de distribuição testados. Contagens em ar ativo UFC/m ³	96
Figura 4-5. Curvas de distribuição traçadas com relação aos dados de monitoramento da sala AL. Note que, apesar de apresentar resultado significativo para o teste de hipótese do tipo de distribuição de Gamma-Poisson, não se observa sobreposição exata da curva ao conjunto de dados.....	97
Figura 4-6. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental da sala CP1.....	100
Figura 4-7. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas CP2, CP3 e C1.....	101
Figura 4-8. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas ML, AL e C2.....	102
Figura 4-9. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas E, R1 e R2.....	103
Figura 4-10. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas IC, EMB e G1.....	104

Figura 4-11. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas G2 e G3.....	105
Figura 4-12. Gráficos <i>Oneway Plot (Oneway analysis)</i> para as Indústrias (<i>Industry</i>) A e B para análise de variância entre os grupos de “salas de processo” (<i>process room</i>) e de “salas de não-processo” (<i>non-process room</i>), quanto aos resultados (<i>result</i>) de ar ativo em monitoramento ambiental.....	112
Figura 4-13. Histogramas de a) Amostragem ativa de ar nas salas de não-processo para Indústria A (a.i.) e B (a.ii.); b) Amostragem ativa de ar nas salas de processo para a Indústria A (b.i.) e B (b.ii.); c) Amostragem de ar passivo para a Indústria A (c.i.) e B (c.ii.); d) Amostragem de superfície para a Indústria A (d.i.) e B (d.ii.). Nota: Os valores apresentados entre parênteses são, respectivamente, o parâmetro estimador λ , “média”, para Poisson e os parâmetros λ , “média” e σ , parâmetro de superdispersão, para Gamma-Poisson. A escala foi ajustada automaticamente pelo software JMP para facilitar a visualização.....	115

QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1-1. Atividade de água mínima requerida para o crescimento de alguns microrganismos (Adaptado de: UNITED, 2018b).....	8
--	---

Quadro 1-2. Atividade de água de representante de produtos farmacêuticos e cosméticos (Adaptado de UNITED, 2018b).....	8
--	---

Capítulo 2

Quadro 2-1. Resumo dos pontos principais encontrados em cada um dos documentos consultados.....	39
---	----

TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2-1. Limites iniciais sugeridos para recuperação em ambientes assépticos (Adaptado de: UNITED, 2018b).....	21
Tabela 2-2. Limites recomendados para recuperação de microrganismos ambientais durante a operação (Adaptado de: JAPANESE, 2011).....	23
Tabela 2-3. Classes de limpeza do ar para partículas, selecionadas para sala e zonas limpas (Adaptado de ISO, 2015).....	27
Tabela 2-4. Classificações do ar (Adaptado de FDA, 2018a).....	28
Tabela 2-5. Limites para contaminação microbiológica, conforme anexo I da RDC 17/2010 (Adaptado de: BRASIL, 2010).....	30
Tabela 2-6. Sistema de classificação do ar para a produção de produtos estéreis, conforme anexo I da RDC 17/2010 (Adaptado de: BRASIL, 2010).....	30
Tabela 2-7. Limites recomendados para avaliação da contaminação microbiológica em áreas classificadas como graus A, B, C e D (Adaptado de: ANVISA, 2013).....	32
Tabela 2-8. Limites recomendados para monitoramento microbiológico de áreas limpas durante a operação (EUROPEAN, 2014b).....	34

Capítulo 3

Tabela 3-1. Salas do ambiente produtivo de produtos farmacêuticos sólidos orais que foram incluídas neste estudo para o monitoramento ambiental.....	47
--	----

Capítulo 4

Tabela 4-1. Resultados obtidos com a realização dos testes de hipóteses dos dados gerais e por sala frente aos diferentes tipos de distribuição com a utilização dos dados completos (O*) e após exclusão de <i>outliers</i> (E*).....	99
--	----

Tabela 4-2. Resumo dos resultados da análise de variância para os subgrupos de dados de ar ativo em monitoramento ambiental para “área de não-processo” e “área de processo”, ambos para as Indústrias A e B.....112

Tabela 4-3. Resultados dos testes de ajuste para distribuição Poisson e Gamma-Poisson para Indústria A e B. Nota: H_0 : Os dados são da distribuição testada. Baixos valores de “p” (p-value) rejeitam H_0116

Tabela 4-4. Resultados da análise de capacidade para cada grupo, para $p = 0,9985$ e quantis determinados para cada grupo como sendo limites de alerta e ação. Os resultados são apresentados para a Indústria A / Indústria B, conforme aplicável.....119

EQUAÇÕES

Capítulo 3

Equação 3-1. Equação previamente usada para determinar cálculo dos limites de alerta.....64

Capítulo 4

Equação 4-1: Equação para determinação de limite de alerta em gráficos de controle de Shewhart.....87

Equação 4-2: Equação para determinação de limite de ação em gráficos de controle de Shewhart.....87

Equação 4-3. Descrição da distribuição de Poisson.....88

Equação 4-4. Equação de Halvorson e Ziegler, onde d é o MPN, s é o valor de amostras que não apresentam crescimento e n o número total de amostras.....91

Equação 4-5. Equação comumente utilizada usada para determinação de limites de alerta em controle de processos assumindo-se distribuição normal dos dados, com base nos parâmetros média \bar{X} e desvio padrão S amostrais.....118

Equação 4-6. Equação comumente utilizada usada para determinação de limites de ação em controle de processos assumindo-se distribuição normal dos dados, com base nos parâmetros média \bar{X} e desvio padrão S amostrais.118

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
FIGURAS	xi
QUADROS	xv
TABELAS	xvi
EQUAÇÕES	xvii
JUSTIFICATIVA	xxiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	3
1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PRODUTOS NÃO-ESTÉREIS	5
1.3 ATIVIDADE DE ÁGUA E A SUA RELAÇÃO COM A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO	6
1.4 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS NÃO-ESTÉREIS	9
1.4.1 O ambiente de produção como fonte de contaminação microbiológica em produtos não-estéreis.....	10
1.4.2 Monitoramento microbiológico ambiental como medida da estratégia de controle	11
1.4.3 Ferramentas para gerenciamento de riscos com foco no ambiente farmacêutico.....	12
2 DIRETRIZES REGULATÓRIAS E FARMACOPEICAS ACERCA DO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO AMBIENTE PRODUTIVO FARMACÊUTICO	15
2.1 EXPECTATIVAS ACERCA DO MONITORAMENTO AMBIENTAL ...	17
2.2 OBJETIVO	17
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.4 DIRETRIZES FARMACOPEICAS	18
2.4.1 Farmacopeia Internacional (Organização Mundial da Saúde – OMS/WHO).....	19
2.4.2 Farmacopeia Europeia (Eu Ph)	20

2.4.3	Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia - USP) .	21
2.4.4	Farmacopeia Japonesa	23
2.4.5	Farmacopeia Brasileira	25
2.5	EXIGÊNCIAS REGULATÓRIAS	27
2.5.1	Food and Drugs Administration (FDA)	28
2.5.2	Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	29
2.5.3	União Europeia	33
2.6	ASPECTOS RELEVANTES DAS DIRETRIZES FARMACOPEICAS E REGULATÓRIAS	35
2.7	CONCLUSÃO	40
3	ISOLADOS MICROBIANOS PROVENIENTES DO AMBIENTE FARMACÊUTICO	41
3.1	MICROBIOTA AMBIENTAL	42
3.2	IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF ..	44
3.3	OBJETIVO	46
3.4	AQUISIÇÃO DOS DADOS	46
3.4.1	Local	46
3.4.2	Pontos de amostragem.....	50
3.4.3	Materiais	58
3.4.3.1	Meios de cultura.....	58
3.4.3.2	Sanitizante	58
3.4.4	Equipamento.....	58
3.4.5	Metodologia de amostragem	59
3.4.6	Transporte das amostras.....	61
3.4.7	Incubação	61
3.4.8	Registro dos resultados	62
3.4.9	Limites aplicáveis.....	64
3.4.10	Identificação microbiana	65
3.4.1	Análise estatística	65
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.5.1	Avaliação qualitativa: determinação da microbiota local.....	66
4	ABORDAGEM ESTATÍSTICA PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL	83
4.1	CONTROLE EM PROCESSOS	85

4.2	MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA APLICADOS A MONITORAMENTO AMBIENTAL	86
4.2.1	Distribuição Normal	86
4.2.2	Distribuição de Poisson e Gamma-Poisson (Binomial Negativa)..	88
4.2.3	Modelos zero-inflacionados	90
4.2.4	Distribuição exponencial negativo	92
4.2.5	Distribuição de Weibull	92
4.2.6	Cartas gráficas com média móvel.....	93
4.3	OBJETIVO	93
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	94
4.4.1	Ambiente de estudo.....	94
4.4.2	Coleta de dados.....	94
4.4.3	Ferramenta estatística	95
4.5	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DOS DADOS.....	95
4.6	DESENVOLVIMENTO DE ABORDAGEM ESTATÍSTICA PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL DE ÁREAS PRODUTIVAS DE MEDICAMENTOS NÃO-ESTÉREIS	109
4.6.1	Primeiro passo: avaliação de possíveis subgrupos de dados	110
4.6.2	Segundo passo: abordagens para avaliação da distribuição.....	113
4.6.3	Terceiro passo: Determinação de limites de alerta e ação	117
4.6.4	Diferenças observadas entre os conjuntos de dados Indústria A e Indústria B.....	120
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

JUSTIFICATIVA

O controle microbiológico durante a produção farmacêutica é de grande importância para a garantia da qualidade do produto final quanto à sua eficácia e à segurança do paciente. Os guias de boas práticas de fabricação e compêndios oficiais abordam estratégias que devem ser aplicadas de acordo com a criticidade do produto, considerando propriedades físico-químicas, via de administração e pacientes alvo. Neste contexto, pouco destaque tem sido dado à manufatura de produtos farmacêuticos não-estéreis, por representar a classe cujo risco de contaminação microbiana é menor, quando comparado aos produtos parenterais. Por outro lado, considerando que, muitas vezes, os testes microbiológicos requeridos para a liberação dos produtos não-estéreis são reduzidos, o programa de gerenciamento de riscos deve ser abrangente para se evitarem riscos aos pacientes, reclamações e até recolhimento do produto.

Dentre as principais fontes de contaminação de produtos não-estéreis encontra-se o ambiente de produção e, por isso, durante os últimos anos, o monitoramento microbiológico ambiental tem sido discutido e recomendado pelas farmacopeias e algumas agências regulatórias como importante ferramenta para medida da efetividade da estratégia de controle de proteção ao produto.

Diante dos aspectos mencionados, este trabalho teve por objetivo caracterizar o ambiente produtivo não-estéril em termos de recuperação microbiana, obtidos com amostragens ambientais de ar ativo, ar passivo e superfície, quanto aos microrganismos mais prevalentes e sua sazonalidade, além da avaliação da distribuição estatística do conjunto de dados. Ainda, objetivou-se o desenvolvimento de uma abordagem estatística para determinação de limites de alerta e ação, quando possível, de maneira adaptada à produção não-estéril, haja vista que a literatura carece de estudos desse tipo.

Por fim, ao atingir os objetivos citados acima, espera-se contribuir com a ciência, destrinchando e agregando informações a respeito das características do ambiente produtivo não-estéril e demonstrar a sua relevância meio aos estudos relacionados à produção estéril, de maior prevalência nas publicações científicas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

A presença de certos microrganismos em preparações farmacêuticas tem o potencial de alterar as propriedades organolépticas do produto, reduzir ou até inativar a sua atividade terapêutica, bem como pode representar riscos à saúde do paciente, seja pela própria contaminação microbiana e/ou aumentando a produção de metabolitos tóxicos (UNITED, 2018a; CHARNOCK, 2004; RATAJACZAK et al., 2015).

Dessa forma, os fabricantes de medicamentos devem assegurar que a carga microbiana no produto final seja aceitável, de acordo com a sua finalidade, aplicando os requerimentos contidos nos guias de boas práticas de fabricação, durante a produção, armazenamento e distribuição das formas farmacêuticas (UNITED, 2018a). A quantidade total aceitável de microrganismos nos produtos farmacêuticos e a ausência de microrganismos indesejáveis dependerão das características físico-químicas dos produtos e insumos, da via de administração e dos pacientes a quem se destinam (UNITED, 2018c; UNITED, 2018f).

Em termos de gerenciamento do risco, existem duas categorias principais de produtos farmacêuticos: (a) estéreis, cuja biocarga é eliminada usando metodologias validadas; e (b) não-estéreis, para os quais a contaminação microbiana é controlada em níveis apropriados (UNITED, 2018c). Isso se deve ao fato de que produtos parenterais são administrados como injetáveis ou aplicados topicamente a tecidos sensíveis e, portanto, apresentam um alto risco de contaminação ao paciente, devendo-se garantir a sua esterilidade e aplicar controles microbianos rígidos durante a produção e limites estreitos para a liberação (UNITED, 2018c). Em contrapartida, produtos não-estéreis são administrados em regiões do corpo humano em que a microbiota é presente e onde existem barreiras físicas e imunológicas contra infecções, como, por exemplo, a cavidade oral, o trato gastrointestinal, nasofaringe, vagina e reto (UNITED, 2018c). Dessa maneira, é esperado que estes produtos possuam certa biocarga, devendo esta ser controlada a níveis que estejam de acordo com a segurança do paciente (UNITED, 2018c). O guia de Boas Práticas de Fabricação da União Europeia determina que uma estratégia de controle de biocarga deve ser desenvolvida utilizando ferramentas para o gerenciamento de

riscos para todos os processos produtivos de medicamentos, para garantir que o produto produzido atenda os requerimentos aplicáveis (EUROPEAN, 2014a). Entretanto, o uso de controles excessivos tende a aumentar a complexidade e o custo de produção sem levar a benefícios à segurança, não agregando valor ao paciente nem ao fabricante (UNITED, 2018c).

Neste contexto, pouco destaque tem sido dado à manufatura de produtos não-estéreis, por representarem as classes cujos riscos de contaminação microbiana são menores, quando comparados aos produtos farmacêuticos parenterais. Por outro lado, considerando que, muitas vezes, os testes microbiológicos requeridos para a liberação dos produtos não-estéreis são reduzidos, o programa de gerenciamento de riscos deve ser bastante abrangente para que sejam evitados riscos aos pacientes/usuários, reclamações e até recolhimento do produto. Um interessante estudo realizado por Sutton e Jimenez (2012) demonstra que os produtos não-estéreis ainda representam uma parcela considerável (22%) dos recolhimentos pelo FDA nos Estados Unidos, sendo 87% destes relacionados à contaminação microbiana, seja pela presença de microrganismos indesejáveis (72%) ou por contaminação microbiológica em geral (15%), como apresentado nas figuras 1-1 e 1-2.

Recolhimentos por tipo de produto

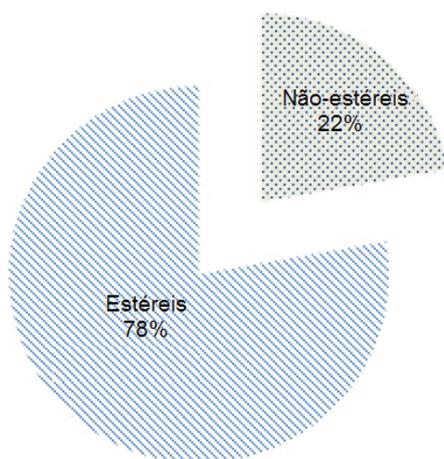


Figura 1-1. Total de recolhimentos pelo FDA de 2004 a 2011 por tipo de produto (Adaptado de: SUTTON & JIMENEZ, 2012).

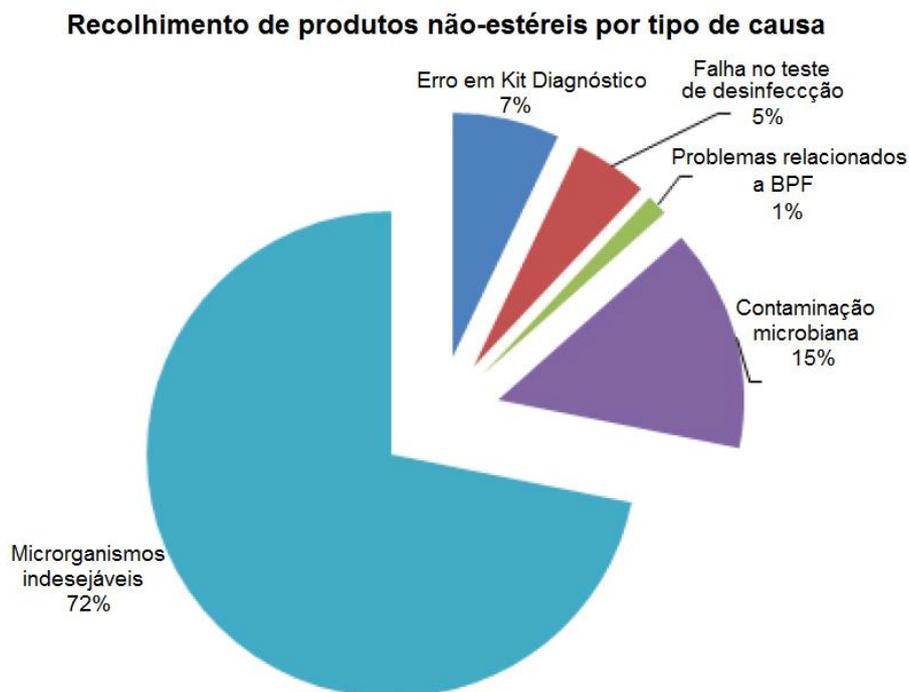


Figura 1-2. Total de recolhimentos de produtos não-estéreis pelo FDA de 2004 a 2011 por tipo de causa (Adaptado de: SUTTON & JIMENEZ, 2012).

Diante dos aspectos apresentados, é de suma importância que, desde o desenvolvimento até a comercialização dos produtos farmacêuticos, em toda a sua cadeia produtiva, sejam adotadas medidas de maneira a minimizar a contaminação microbiana. Essa prática evitará danos à saúde do paciente e prejuízos à empresa, sejam estes monetários diretos, devido aos custos atrelados ao recolhimento do produto, ou indiretos, relacionados à perda da confiança dos clientes após esse tipo de ocorrência.

1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PRODUTOS NÃO-ESTÉREIS

Durante o desenvolvimento dos produtos farmacêuticos é imprescindível que se determinem as propriedades e/ou características que deverão estar presentes no produto final, de acordo com o uso pretendido, e que constituirão seus parâmetros de qualidade. A este conjunto de características dá-se o nome de especificação, a qual deverá abranger aspectos físico-químicos e

microbiológicos para que atenda às necessidades do paciente. Estas necessidades podem ser traduzidas em limites de segurança e eficácia. É nessa etapa que deverão ser reunidas informações com a respeito à maior ou menor susceptibilidade à contaminação como: propriedades antimicrobianas intrínsecas, atividade de água (a_w), concentração de nutrientes, presença de surfactantes, pH e concentração iônica. Ainda durante o desenvolvimento, deverão ser determinados os microrganismos que são potencialmente danosos ao produto, mesmo em baixas quantidades ou patogênicos, e que, por esses motivos, deverão estar ausentes (UNITED, 2018b).

Por se tratar de um fator limitante para o crescimento microbiano a atividade de água será tratada com maiores detalhes na seção 1.3.

1.3 ATIVIDADE DE ÁGUA E A SUA RELAÇÃO COM A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO

É de conhecimento geral que a água é um fator imprescindível para a existência da vida. Nesse sentido, o conteúdo de água presente em um produto farmacêutico está relacionado à presença e à prevalência de microrganismos, sendo determinante para a sua estabilidade durante seu ciclo de vida (UNITED, 2018b; MANEFFA et al., 2017).

O conteúdo de água de um produto pode ser medido por ensaios rotineiros para determinação de umidade, como, por exemplo, titulação pelo método de Karl Fischer. Entretanto, em alguns casos, a medida da umidade total pode não representar a real susceptibilidade do produto à contaminação microbiana, uma vez que a água poderá não estar disponível para a utilização pelo microrganismo. Para isso, é necessário que se conheça a quantidade de água livre, a qual se dá o nome de atividade de água (a_w) (MANEFFA et al., 2017).

De acordo com o FDA, a atividade de água do produto é a razão entre os fatores: (a) pressão de vapor deste produto, quando em completo equilíbrio com o ambiente circundante, e (b) pressão de vapor da água pura às mesmas

condições, podendo seu valor, numérico e adimensional, variar de 0 a 1 (FDA, 2018b).

Conhecer o a_w do produto permite que certas decisões quanto à sua qualidade microbiológica sejam tomadas como para a otimização da sua formulação, de forma a melhorar a efetividade do sistema conservante e/ou diminuir a sua susceptibilidade à contaminação microbiana. Além disso, conhecendo o a_w do produto final, é possível promover um racional técnico para a redução da frequência de testes microbiológicos para liberação e durante estudos de estabilidade (UNITED, 2018b).

A maioria dos microrganismos necessita de uma atividade de água (a_w) acima de 0,75 para se multiplicar, conforme quadro 1-1 (UNITED, 2018b). Dessa forma, medicamentos com a_w inferior a este valor tendem a prevenir o crescimento microbiano, embora organismos resistentes, formadores de esporos, incluindo os dos gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Salmonella*, bem como fungos filamentosos, apesar de não proliferarem, podem persistir no produto final (UNITED, 2018b). Rodríguez-Uerrego et al. (2010) descreveram a ocorrência de um surto de salmonela devido ao consumo de produtos com baixa umidade, demonstrando a persistência deste microrganismo mesmo nessas condições, o que é agravado pelo fato de que o nível de contaminação necessário para causar uma infecção deste tipo é extremamente baixo.

O quadro 1-2 traz valores típicos de a_w dos grupos de medicamentos não-estéreis mais comumente utilizados. Formas farmacêuticas orais sólidas, como cápsulas e comprimidos, tem como característica baixa atividade de água, a qual permanece abaixo de 0,4 (UNITED, 2018b), sendo, hierarquicamente, os produtos de menor risco para contaminação microbiológica (UNITED, 2018c). Portanto, são excelentes candidatos a testes microbiológicos reduzidos para liberação de lotes e avaliação da estabilidade, desde que o programa de gerenciamento de riscos adotado preveja que os materiais de partida tenham boa qualidade microbiológica e que os processos e o ambiente produtivo não sejam fontes de contaminação ao produto (UNITED, 2018c). Por outro lado, considerações especiais deverão ser feitas quanto aos produtos líquidos e

semissólidos, já que, por conterem, intrinsecamente, elevada atividade de água, poderão sofrer mais facilmente uma contaminação microbiológica.

Quadro 1-1. Atividade de água mínima requerida para o crescimento de alguns microrganismos (Adaptado de: UNITED, 2018b).

Bactéria	Atividade de água (a_w)	Bolores e Leveduras	Atividade de água (a_w)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97	<i>Rhizopus nigricans</i>	0,93
<i>Bacillus cereus</i>	0,95	<i>Mucor plumbeus</i>	0,92
<i>Clostridium botulinum</i> , Tipo A	0,95	<i>Rhodotoula mucilaginosa</i>	0,92
<i>Escherichia coli</i>	0,95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	<i>Paecilomyces variotti</i>	0,84
<i>Lactobacillus viridescens</i>	0,95	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,83
<i>Salmonella</i> spp.	0,95	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,82
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,94	<i>Penicillium glabrum</i>	0,81
<i>Bacillus subtilis</i>	0,90	<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Micrococcus lysodekticus</i>	0,93	<i>Aspergillus niger</i>	0,77
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	<i>Zygosachharomyces rouxii</i>	0,62
<i>Halobacterium halobium</i> (bactéria halofílica)	0,75	<i>Xeromyces bisporus</i> (fungo xerofílico)	0,61

Quadro 1-2. Atividade de água de representante de produtos farmacêuticos e cosméticos (Adaptado de UNITED, 2018b).

Produto	Atividade de água (a_w)	Produto	Atividade de água (a_w)
Inalantes nasais	0,99	Pomadas tópicas	0,55
Xampu para cabelos	0,99	Batons	0,36
Antiácidos	0,99	Supositórios	0,30
Cremes tópicos	0,97	Comprimidos	0,36
Líquidos orais	0,90	Cápsulas líquidas	0,30
Suspensões orais	0,87		

1.4 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE PRODUTOS NÃO-ESTÉREIS

Durante a manufatura de produtos não-estéreis, diversos fatores contribuem para a contaminação microbiana, conforme esquematizado na figura 1-3. Dessa maneira, é esperado que a estratégia de controle de contaminação ao produto contemple meios de mitigação dos riscos para estes fatores. Uma avaliação crítica de todo o processo é necessária para prevenir que existam condições nas áreas produtivas que favoreçam o ingresso e a proliferação de microrganismos (UNITED, 2018c).

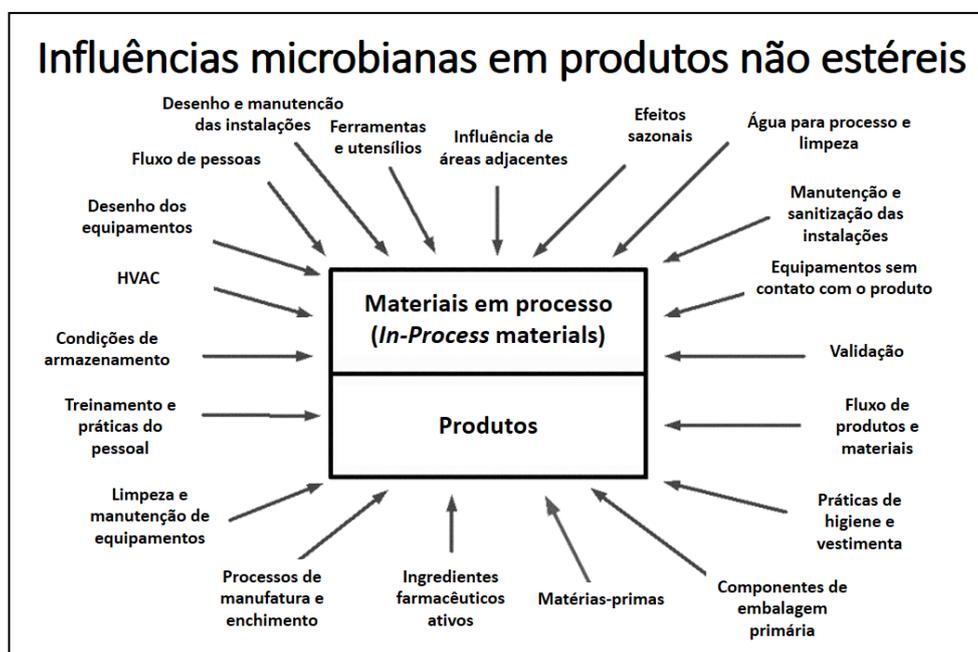


Figura 1-3. Fatores que contribuem para a biocarga de produtos não-estéreis (Adaptado de: UNITED, 2018c).

De acordo com o capítulo 1115 da Farmacopeia Americana (USP), os fatores que possuem maior probabilidade de levarem à contaminação microbiana do produto final são, nesta ordem, (a) água como insumo, (b) matérias-primas, (c) equipamentos de processo, (d) pessoal de manufatura e (e) o ambiente de produção (UNITED, 2018c) sendo, este último, o enfoque deste trabalho.

1.4.1 O ambiente de produção como fonte de contaminação microbiológica em produtos não-estéreis

O ambiente produtivo é considerado uma das principais fontes de contaminação microbiana em produtos farmacêuticos. Como parte integrante da estratégia de controle, as áreas de produção não-estéris devem estar desenhadas de maneira a evitar a entrada e proliferação de microrganismos. O guia da Anvisa sobre “Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica” recomenda que as áreas produtivas não-estéreis sejam desenhadas de acordo com os requerimentos contidos na ISO-14644 de forma que atendam à classificação ISO 8 (ANVISA, 2013) para salas limpas, levando a um maior controle de partículas nas áreas, que podem ser carreadoras de microrganismos (FARMACOPEIA, 2010).

Para isso, o sistema HVAC, deverá estar equipado com instalação adequada de filtros e dispor de diferencial de pressão adequado, de maneira a evitar o carreamento de partículas pelo ar. Ainda, é necessário determinar o programa de manutenção do sistema HVAC e troca periódica de filtros (ANVISA, 2013). De maneira equivalente, deve-se determinar limites de temperatura e umidade os quais devem ser continuamente monitorados no ambiente produtivo, de forma que evitem o estabelecimento de condições que favoreçam o crescimento microbiano (ANVISA, 2013).

As superfícies devem ser de fácil limpeza e sanitização, revestidas de material liso, impermeável, lavável e resistente, livres de juntas e rachaduras, permitindo a desinfecção e sem liberar partículas (ANVISA, 2013). Deverá haver separação física entre as áreas produtivas e o ambiente externo (ANVISA, 2013). É imprescindível que, durante reformas, haja o isolamento das áreas impactadas de maneira adequada. Estudos demonstram que reformas estão tipicamente associadas ao aumento da recuperação de fungos em amostras ambientais (SARUBBI et al., 1982). Quando não adequadamente gerenciadas e isoladas, a ocorrência de reformas no ambiente produtivo poderá representar prejuízos ao produto farmacêutico e à segurança do paciente, devido à exposição a elevado risco de contaminação.

Complementarmente, um programa de controle de pragas deverá ser implementado de maneira a evitar a entrada de animais e/ou insetos que, potencialmente, podem transportar microrganismos, incluindo os patogênicos (ANVISA, 2010).

1.4.2 Monitoramento microbiológico ambiental como medida da estratégia de controle

Como forma de ponderar se as medidas de mitigação do risco estão em controle, o ambiente produtivo deve ser monitorado quanto à contaminação microbiológica. O Programa de Monitoramento Microbiológico Ambiental refere-se à avaliação da qualidade do ar, por meio de amostragens de forma ativa ou passiva, e do monitoramento de superfícies críticas. As técnicas comumente empregadas para medir a carga microbiana envolvem: coleta por meio de amostradores de ar (amostragem ativa) como os de impactação, centrífuga e impinger, entre outros; sedimentação (amostragem passiva), realizada com a exposição de placas contendo meio de cultura tipo ágar; técnica de contato, realizada diretamente sobre a superfície de pontos críticos, utilizando placas contendo meio de cultura, por exemplo placas RODAC® (*Replicated Organisms Detection and Counting*) e coletas com hastes flexíveis (*swabs*), semeados diretamente ou após suspensão (SBCC, 2017).

O conhecimento das características microbiológicas ambientais da planta, bem como seu comportamento frente a variações sazonais garante maior segurança ao paciente e qualidade aos produtos. A existência de um programa de monitoramento ambiental, como parte integrante da estratégia de controle, permite que seja realizado um acompanhamento das condições ambientais e de higiene da planta (MILLER et al., 2009). Neste sentido, a avaliação crítica dos resultados é de extrema importância quando se busca a excelência operacional e o controle de seus processos, o que garante que, quando detectadas tendências ou resultados atípicos, seja possível tomar ações antes que ocorram impactos significativos nos produtos (PRINCE, 2008).

1.4.3 Ferramentas para gerenciamento de riscos com foco no ambiente farmacêutico

Tendo em vista o importante papel do monitoramento ambiental como mensurador da efetividade da estratégia de controle de proteção ao produto, a avaliação de riscos é essencial para o delineamento de um programa de amostragem adequado.

O ambiente da indústria farmacêutica, da maneira como o conhecemos, é influenciado pelo desafio de um balanço apropriado entre o cumprimento dos requerimentos, cada vez mais restritos, presentes nos guias BPF e outros documentos regulatórios, versus a aplicação da análise de riscos. O Gerenciamento de Riscos da Qualidade (QRM) por meio de uma maior compreensão dos processos, permite uma melhor proteção aos produtos e, em alguns casos, dos funcionários, podendo ser utilizado para atender as expectativas regulatórias e/ou buscar processos mais eficientes (PHOENIX & ANDREWS, 2003).

O gerenciamento de riscos não é uma atividade pontual e, embora seja útil como uma ferramenta para responder a problemas, é melhor visto como uma forma proativa para evitar riscos. A gestão de riscos é parte integrante das filosofias de Qualidade por Design (QbD) e Ciclo de Vida do Produto. Tem por objetivo avaliar, controlar e revisar sistematicamente os processos de manufatura em termos de prioridades e, em seguida, desenvolver medidas apropriadas de controle dos riscos (SANDLE, 2012).

Considerando o ambiente produtivo como uma importante fonte de contaminação microbiana aos produtos farmacêuticos, deve-se considerar a execução de um gerenciamento de riscos documentado, sendo que a profundidade e a formalidade como será desenvolvido irá depender da criticidade da área que está sendo avaliada (SANDLE, 2012).

Existe uma variedade de ferramentas disponíveis para realizar o gerenciamento de riscos, as quais podem ser consultadas no documento “Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century: A Risk-Based Approach” da FDA ou no guia do ICH “Q9 - Quality Risk Management”. Como exemplo de

ferramentas, podem-se citar FTA (*Fault Tree Analysis*), FMEA (Failure Mode and Effect Analysis) e HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). O sistema HACCP foi desenvolvido inicialmente para aplicação na indústria de alimentos e, portanto, é mais facilmente aplicável à farmacêutica por utilizar princípios familiares e considera métodos de controles e monitoramento como parte importante do sistema (WHYTE, 2002). Por esse motivo, o HACCP tem sido usualmente aplicado para controle de contaminação microbiana (WHYTE & EATON, 2004).

Alguns autores, ainda, descrevem uso de modelos de cálculos que envolvem as taxas de dispersão, transferência e deposição da contaminação microbiológica e que podem ser úteis no delineamento e avaliação do programa de monitoramento ambiental (WHYTE & EATON, 2004; TIDSWELL & MCGARVEY, 2006).

A aplicação e interpretação de avaliações de riscos permite a escolha racional de métodos de monitoramento, frequência e localização de pontos de amostragem, possibilitando a identificação de áreas mais vulneráveis à contaminação ou perda de controle de particulado (TIDSWELL & MCGARVEY, 2006). Dessa maneira, o delineamento de um programa de monitoramento ambiental baseado na avaliação de riscos tende a ser mais robusto e direciona os esforços para a manutenção da estratégia de controle, por possuir uma relação mais próxima com a real contaminação ambiental da área produtiva.

**2 DIRETRIZES REGULATÓRIAS E FARMACOPEICAS ACERCA DO
CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO AMBIENTE PRODUTIVO
FARMACÊUTICO**

2.1 EXPECTATIVAS ACERCA DO MONITORAMENTO AMBIENTAL

O controle microbiano durante a produção farmacêutica é crucial para garantia da qualidade microbiológica dos produtos. Dependendo da criticidade de cada produto farmacêutico, com base na sua susceptibilidade à contaminação, via de administração e pacientes-alvo, é esperado que os níveis de controles aplicáveis variem. Dentro do contexto atual da globalização, é cada vez mais comum que as indústrias farmacêuticas exportem seus produtos para outros países. Como consequência, estarão sujeitas a requerimentos de mais de uma entidade regulatória, cujas exigências podem variar (ICH, 2018).

Por esse motivo, uma avaliação aprofundada dos documentos oficiais disponíveis é essencial para que sejam atendidos os requerimentos necessários, garantindo ao produto farmacêutico uma qualidade adequada aos pacientes a que ele se destina, a qual, muitas vezes, não é realizada da maneira apropriada.

Por abranger particularidades, em termos de gerenciamento de riscos microbiológico, os produtos não-estéreis tem tido pouco destaque nos documentos regulatórios e compêndios oficiais. Ao mesmo tempo, existe uma tendência crescente, durante as auditorias dos últimos anos, relacionada ao tema, o que, muitas vezes poderá deixar as indústrias farmacêuticas com pouco respaldo.

2.2 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo reunir os principais requerimentos contidos na legislação e as diretrizes farmacopeicas em nível mundial a respeito do controle microbiano em ambientes não-estéreis, demonstrando o nível de alinhamento entre eles. Ainda, espera-se contribuir com os profissionais das indústrias farmacêuticas deste ramo, quanto aos requerimentos atualmente efetivos ou recomendados e onde encontrar as informações relevantes, seja para a construção da estratégia de controle ou como forma de embasar respostas a auditorias, haja vista que, muitas vezes, a busca por esse tipo de

informação poderá ser dificultada pela sua escassez e falta de especificidade dos requerimentos aplicáveis a esse tipo de produção.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada avaliação dos conteúdos disponíveis nas versões vigentes das Farmacopeias Internacional (Int Ph), Europeia (EU Ph), Americana (USP), Japonesa (JP) e Brasileira (FB), de forma a verificar os critérios, diretrizes e orientações a respeito do controle de contaminação microbiana, com foco no ambiente produtivo farmacêutico.

Para as farmacopeias disponíveis em inglês, devido à vasta quantidade de informação, foram realizadas buscas nos compêndios eletrônicos com os termos “aseptic”, “sterile”, “area classification”, “cleanrooms” “environmental monitoring”, “microbiological environmental monitoring” e “bioburden” isolados ou em combinação. Para a Farmacopeia Brasileira, redigida na língua portuguesa, usou-se a tradução dos mesmos termos: “salas limpas”, “monitoramento ambiental”, “monitoramento microbiológico ambiental” e “biocarga” para a construção das buscas. De maneira complementar e independentemente dos resultados da busca, alguns capítulos-chave a respeito dos temas foram consultados.

No caso dos requerimentos regulatórios, como legislações e guias, foram reunidos documentos referência no tema, emitidos pelas agências regulatórias do Brasil (ANVISA), dos Estados Unidos (FDA) e da União Europeia, sendo estes lidos na íntegra para a construção do conhecimento. Ainda, em nível mundial, utilizou-se como base o padrão da International Organization for Standardization ISO-14644 por ter seu uso bastante consolidado na produção asséptica.

2.4 DIRETRIZES FARMACOPEICAS

A harmonização das farmacopeias, iniciada em 1990 com a Conferência Internacional em Harmonização (ICH), teve como objetivo padronizar os

requerimentos contidos nas três principais farmacopeias: Farmacopeia Europeia (EU Ph), Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Japonesa (JP), de forma a reduzir os custos totais da pesquisa farmacêutica, evitando trabalhos duplicados, tais como a preparação de processos e estudos, reduzindo assim o tempo necessário para a disponibilização de medicamentos inovadores (COUNCIL, 2016; ICH, 2018).

Dessa maneira, espera-se que os conceitos gerais a respeito da classificação de áreas limpas e seu gerenciamento de riscos seja semelhante entre as principais farmacopeias ao redor do mundo. A seguir, encontram-se as considerações para cada uma das farmacopeias consultadas.

2.4.1 Farmacopeia Internacional (Organização Mundial da Saúde – OMS/WHO)

A quinta edição da Farmacopeia Internacional, produzida pela Organização Mundial da Saúde, aborda a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos estéreis nas seções de “Preparações Parenterais” (“Parenteral Preparations”) e “Preparações Oftálmicas” (“Ophtalmic Preparations”). Neste quesito, determina que “deve haver controles de processos durante a manufatura de medicamentos parenterais, que sejam devidamente validados, como o monitoramento das condições ambientais, especialmente material particulado e contaminação microbiana” (INTERNATIONAL, 2015a; INTERNATIONAL, 2015b). Entretanto, não apresenta detalhes acerca de classificação de áreas, limites de ação, metodologia de análise em monitoramento ambiental e avaliação de tendência.

A respeito dos medicamentos não-estéreis, a monografia “Formas de Dosagem Semissólidas Tópicas” (“Topical semi-solid dosage forms”) cita o controle do ambiente produtivo quando descreve que, durante a manufatura destes produtos, devem ser levadas em consideração as “condições ambientais, principalmente, quanto à contaminação microbiana e contaminação cruzada” (INTERNATIONAL, 2015c). Porém, da mesma forma que para medicamentos estéreis, não apresenta nenhuma diretriz a respeito do monitoramento ambiental durante o processo. Para as demais formas farmacêuticas não-estéreis,

medicamentos líquidos orais, cápsulas, comprimidos, preparações retais e pós orais, determina que devem ser tomadas medidas a fim de prevenir, entre outras, a contaminação microbiana durante a manufatura (INTERNATIONAL, 2015d; INTERNATIONAL, 2015e; INTERNATIONAL, 2015f; INTERNATIONAL, 2015g; INTERNATIONAL, 2015h), porém, não inclui o monitoramento microbiológico dentre os controles de processo citados, referenciando apenas o capítulo “Qualidade microbiológica de produtos não-estéreis: critérios de aceitação recomendados para preparações farmacêuticas” (“Microbiological quality of non-sterile products: recommended acceptance criteria for pharmaceutical preparations”) para consulta aos limites microbianos do produto acabado.

2.4.2 Farmacopeia Europeia (Eu Ph)

Foi consultada a versão 9.7 da Farmacopeia Europeia, elaborada pelo principal órgão de decisão europeu, o Conselho da União Europeia. Pouca informação a respeito de ambientes classificados foi encontrada. Entretanto, é referenciada a utilização de guias de Boas Práticas de Fabricação como o Guia BPF da Comunidade Europeia (EUROPEAN, 2014b) como base para o desenho do processo, limites e monitoramento, detalhes os quais serão discutidos posteriormente no item 2.5.3. Além disso, alguns conceitos são reforçados, por exemplo, no item 5.1 desta Farmacopeia (“General texts on microbiology”), em que, no item específico para o preparo de produtos estéreis, é enfatizada a necessidade do estabelecimento de um programa de monitoramento ambiental nas áreas de produção assépticas, as quais devem ser “desenhadas para diminuir a contaminação microbiana dos produtos” e manter a esterilidade ao serem “monitoradas superfícies críticas, o ambiente de processo e o pessoal” (EUROPEAN, 2016a).

Quanto à metodologia aplicada ao monitoramento ambiental, a Farmacopeia é bastante abrangente, apresentando desde as técnicas tradicionais até as mais modernas, como métodos rápidos alternativos. O item 5.1.6 “Alternative methods for control of microbiological quality” elenca diversas técnicas, suas limitações em comparação aos métodos clássicos e suas

aplicações, sendo, muitas delas, potencialmente viáveis para monitoramento ambiental, desde a quantificação até a identificação dos isolados microbianos (EUROPEAN, 2014b).

2.4.3 Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia - USP)

Acerca da produção de medicamentos estéreis, a Farmacopeia Americana (USP 41) traz o capítulo 1116 “Controle e monitoramento microbiológico de ambientes de produção assépticos” (“Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments”). A classificação de salas limpas segue a nomenclatura utilizada na ISO 14644-1 para a determinação de material particulado, sendo as classes ISO 5, ISO 6, ISO 7 e ISO 8 aplicáveis para a produção asséptica. Assim como a ISO, considera que os limites apresentados são aplicáveis à contagem cumulativa de partículas maiores ou iguais a 0,5 µm (UNITED, 2018d).

Não é mandatória quanto aos limites microbianos e apresenta como limitação do monitoramento microbiológico ambiental as técnicas de amostragem empregadas, que não são capazes de recuperar todos os microrganismos do ambiente controlado (WILSON, 2001; UNITED, 2018d), além de terem pouca precisão e serem limitados a um determinado volume de amostragem (UNITED, 2018d). Neste sentido, afirma que a ausência de crescimento de partículas viáveis não poderá provar a total ausência de contaminação microbiana em um ambiente ou superfície (UNITED, 2018d). Dessa maneira, considera que o monitoramento microbiológico deverá ser tratado de maneira semi-quantitativa, de forma a prover informações suficientes de que o ambiente asséptico de processo está em um estado de controle adequado (UNITED, 2018d).

Levando em conta essas limitações, a Farmacopeia considera que a avaliação de tendências em relação aos resultados numéricos pode levar à tomada de ações injustificáveis, uma vez que a recuperação pode variar em uma escala de $\pm 0,5 \log_{10}$, sendo que valores que estejam entre 5 a 10 vezes maiores ou menores não são significativamente diferentes (UNITED, 2018d). Por esse motivo, a frequência da ocorrência de crescimento microbiano nas áreas limpas,

independentemente de suas contagens numéricas, pode ser considerada como uma forma de avaliação de tendências (BAR, 2015). Assim sendo, os limites sugeridos pela farmacopeia, apresentados na tabela 2-1, se baseiam na porcentagem de recuperação de contaminação considerando todos os pontos amostrados por área limpa. Apesar de dar abertura quanto à reavaliação dos limites de acordo com o histórico de cada área, aconselha que ações sejam tomadas em casos de extrapolação dos limites sugeridos (UNITED, 2018d).

Especificamente para as áreas ISO 5, cuja proximidade com o produto e seus componentes faz com que esta seja uma zona crítica, apresenta o conceito das “excursões significativas”, ou seja, determina que valores acima de 15 UFC/placa para qualquer tipo de amostragem deverá ser tratada como uma perda significativa do controle, tendo em vista a ocorrência bastante infrequente destes valores (UNITED, 2018d). A investigação acerca deste resultado suspeito deverá avaliar se a ocorrência se relaciona com outras recuperações encontradas previamente (cerca de duas semanas antes da ocorrência) ou se a situação trata-se de um evento isolado (UNITED, 2018d). Em casos em que não se comprovarem relações com resultados anteriores, possivelmente, não poderá ser encontrada a causa raiz, pela ausência de evidência científica sólida para as conclusões, sendo aplicadas apenas medidas corretivas (UNITED, 2018d).

Tabela 2-1. Limites iniciais sugeridos para recuperação em ambientes assépticos (Adaptado de: UNITED, 2018b).

Classificação da sala	Amostra de ar ativo (%)	Placas de exposição 4h (9cm) (%)	Superfície ou swab (%)	Luva ou vestimenta (%)
ISO 5	< 1	< 1	< 1	< 1
ISO 6	< 3	< 3	< 3	< 3
ISO 7	< 5	< 5	< 5	< 5
ISO 8	< 10	< 10	< 10	< 10

A respeito da identificação microbiana, aborda a sua importância para a previsão da microbiota usual das instalações, para a investigação das fontes de contaminação e para a avaliações de efetividade de sanitização e tendências, sendo a identificação microbiana de áreas críticas e áreas adjacentes (ISO 5 e 6) prioritária em relação a áreas menos críticas (UNITED, 2018d).

Quanto à produção de não-estéreis, a Farmacopeia Americana USP-41, no capítulo 1115 “Controle de biocarga de substâncias e produtos não-estéreis” (“Bioburden control of nonsterile drug substances and products”), afirma que, durante a produção de medicamentos não-estéreis, não são requeridos ambientes classificados, como, por exemplo, os especificados na ISO 14644-1 ou em guias BPF (classes A, B, C ou D), não requerendo, portanto, a prática de monitoramento ambiental (UNITED, 2018c).

Entretanto, afirma que, embora a contaminação ambiental não seja a principal causa de recolhimentos de produtos farmacêuticos não-estéreis, o monitoramento ambiental pode ser parte do programa de controle microbiológico, cuja função não é diminuir o risco, mas sim funcionar como uma medida sentinela (UNITED, 2018c). Ainda, acrescenta que, quando aplicado à produção de não-estéreis, o monitoramento ambiental é considerado como informativo das condições higiênicas da área, e, ao contrário da produção asséptica, não é detrimental para a liberação de produtos (UNITED, 2018c).

2.4.4 Farmacopeia Japonesa

A versão 16 da Farmacopeia Japonesa apresenta uma seção específica para a avaliação do ambiente de manufatura de produtos estéreis denominada “Métodos de monitoramento microbiológico ambiental de áreas de processamento para produtos farmacêuticos estéreis” (“Microbiological Environmental Monitoring Methods of Processing Area for Sterile Pharmaceutical Products”).

Determina que a sala pode se encontrar em duas formas: repouso ou operação, e que os limites nestas duas situações são diferentes para partículas em suspensão, mas são os mesmos para contaminação microbiana (JAPANESE, 2011).

Classifica a área limpa nas categorias A e B, sendo a primeira, onde se realizam as operações propriamente ditas e mais crítica que a segunda,

caracterizada como uma área multipropósito que circunda as áreas classe A. (JAPANESE, 2011).

Já as áreas que possuem, comparativamente, baixa prevenção da contaminação microbiana por apresentarem menor risco de contaminação ao produto final, são classificadas como C e D (JAPANESE, 2011). Os limites considerados por esta farmacopeia encontram-se na tabela 2-2.

Ainda, faz referência ao guia da ISO 14644-1 ao explicitar que os limites de partículas em suspensão determinados para a condição “em operação” para as classes Classes A, B e C referem-se às classificações ISO 5, 7 e 8 (JAPANESE, 2011).

Tabela 2-2. Limites recomendados para recuperação de microrganismos ambientais durante a operação (Adaptado de: JAPANESE, 2011).

Classe	Microrganismos do ar		Microrganismos de superfícies	
	Amostra de ar ativo (%)	Placas de exposição 4h (9cm) (%)	Superfície ou swab (%)	Luva ou vestimenta (%)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-----
D	200	100	50	-----

Discorre a respeito do número mínimo de pontos de amostragem, o qual dependerá da área total da sala limpa, devendo ser monitorados fungos e bactérias e recomenda que ocorra a identificação em nível de espécie dos microrganismos recuperados nas áreas classes A e B (JAPANESE, 2011).

Quanto à avaliação dos resultados de monitoramento ambiental, cita que esta deve ocorrer em curto e longo prazo e que devem ser avaliados os itens: mudanças no número de microrganismos durante um período de tempo; mudanças nas espécies detectadas; mudanças nos pontos de monitoramento revisão da adequabilidade dos limites de alerta e de ação; revisão da frequência de resultados positivos de cada operador e mudanças que possam impactar nos resultados de monitoramento. Considera importante a avaliação de tendências para detectar potenciais deteriorações do ambiente produtivo e as possíveis

causas antes que isso ocorra, sugerindo a utilização de gráficos de controle para o cálculo de limites e monitoramento dos resultados (JAPANESE, 2011).

A descrição dos critérios relacionados ao ambiente produtivo de medicamentos não-estéreis é escassa, não sendo abordada nesta farmacopeia.

2.4.5 Farmacopeia Brasileira

Foi consultada a Farmacopeia Brasileira versão 5.0, aprovada conforme RDC Nº. 49, DE 23 DE NOVEMBRO DE 2010. A Farmacopeia aborda, separadamente, os requisitos necessários para ensaios microbiológicos de medicamentos estéreis e não-estéreis na seção 5.3.3. Apesar de não determinar como deve ser realizado o monitoramento ambiental de produtos não-estéreis, cita que a frequência dos testes microbiológicos para a liberação destes produtos poderá ser reduzida, a depender dos “dados históricos dos testes de monitoramento microbiológico tanto o ambiental quanto o de equipamentos” (FARMACOPEIA, 2010), o que nos leva a crer que o programa de monitoramento ambiental, como parte integrante da análise de riscos, é essencial quando se deseja obter reduções de custos com análises desnecessárias.

Em contrapartida, os requerimentos acerca da produção de medicamentos estéreis são bem consolidados, sendo apresentados em seu item 7.4 “Salas limpas e ambientes controlados associados” (FARMACOPEIA, 2010). Neste quesito, a Farmacopeia Brasileira preza pela padronização da metodologia de amostragem uma vez que reforça que “a aplicação imprópria de amostragem e análises microbiológicas pode causar variabilidade significativa e potencial para contaminação inadvertida” (FARMACOPEIA, 2010).

A classificação de áreas é apresentada com base na norma ABNT NBR ISO 14644-1 (FARMACOPEIA, 2010), ou seja, limita-se à quantificação de partículas em suspensão, não sendo apresentados limites para contaminação microbiana. Aborda a preocupação das indústrias acerca da determinação de partículas viáveis, mas afirma que é aceitável a “justificativa de que quanto

menor o número de partículas presentes em uma sala limpa, menos provável que micro-organismos carregados pelo ar estejam presentes (...) desde que não haja mudanças no fluxo de ar, na temperatura e na umidade” (FARMACOPEIA, 2010), embora não haja suficientes estudos na literatura que comprovem que haja correlação o número de entre partículas viáveis e não-viáveis recuperadas no ambiente produtivo (ABREU et al., 2004)

Afirma que o estado de controle operacional deverá ser determinado com base nos dados dinâmicos (em operação), assim como determinado na norma ISSO-14644-1 (FARMACOPEIA, 2010, ISO, 2015).

Ainda, no item 7.4.2 “Programa de avaliação microbiológica para salas limpas e ambientes controlados associados”, aborda a importância da implementação de programas de monitoramento microbiológico, de maneira complementar ao monitoramento de partículas, com a justificativa de que “a limitação básica dos contadores de partículas é que normalmente medem partículas de 0,5 µm a 10 µm e os microrganismos carregados pelo ar (...) frequentemente se associam com partículas de 10 a 20 µm” (FARMACOPEIA, 2010). Por outro lado, não restringe os limites microbianos que devem ser aplicados para cada área classificada, mas, como outros guias, afirma que “os princípios e conceitos de controle de processos estatísticos são úteis para estabelecer níveis de alerta e ação” e que devem ser determinados de acordo com os dados históricos (FARMACOPEIA, 2010, ABREU et al., 2004), para processos bem estabelecidos e para instalações novas, os níveis devem ser baseados em experiências anteriores de instalações e processos similares (FARMACOPEIA, 2010).

Por fim, fornece diretrizes para a determinação da frequência e dos pontos de amostragem de acordo com a criticidade do processo e exposição do produto.

2.5 EXIGÊNCIAS REGULATÓRIAS

As agências regulatórias ao redor do mundo demonstram grande preocupação a respeito da produção farmacêutica, principalmente, quando se referem a preparações cuja eventual contaminação microbiana apresenta alto risco ao paciente, como, por exemplo, medicamentos parenterais. A ISO - International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normatização) é uma organização internacional não governamental e independente que conta com membros de 163 países, os quais são representados por especialistas que, de forma voluntária, dividem experiências e conhecimentos para desenvolver padrões internacionais que sejam consensuais e relevantes para o mercado internacional (ISO, 2018). A ISO apresenta o principal guia, usado vastamente como referência, para construção e monitoramento de áreas limpas, o ISO-14644 “Cleanrooms and associated controlled environments”. Entretanto, este guia tem como foco a classificação e o controle total de partículas em suspensão, encontrando-se fora do escopo “a determinação da natureza (...) viável das partículas” (ISO, 2015), assim sendo, a classificação ISO não determina os limites de contaminação microbiana para cada uma das classificações apresentadas (PINTO et al., 2015). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) apresenta as diretrizes do guia da ISO-14644 na forma de resolução normativa ABNT NBR ISO 14644-1:2005 “Salas limpas e ambientes controlados associados”, que, apesar de ainda se referir à versão anterior, implementa-se, assim, uma norma brasileira a respeito do tema.

No que diz respeito a partículas não-viáveis, a ISO apresenta a classificação com base nos diferentes níveis de partículas que se deseja obter em um ambiente de processo, sendo estes de tamanho de partículas maiores ou iguais a: 0,1 μm , 0,2 μm , 0,3 μm , 0,5 μm , 1 μm e 5 μm , cujos limites são apresentados na tabela 2-3 (ISO, 2015).

Tabela 2-3. Classes de limpeza do ar para partículas, selecionadas para sala e zonas limpas (Adaptado de ISO, 2015).

Número de classificação ISO (N)	Limites máximos de concentração (partículas/m ³ de ar) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados.					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO Classe 1	10	----	----	----	----	----
ISO Classe 2	100	24	10	----	----	----
ISO Classe 3	1 000	237	102	35	----	----
ISO Classe 4	10 000	2 370	1 020	352	83	----
ISO Classe 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	----
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

2.5.1 Food and Drugs Administration (FDA)

O Guia da FDA para a produção asséptica (FDA Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice) classifica as áreas de acordo com o limite de partículas de tamanho 0,5 µm por pé cúbico, com base no guia ISO 14644-1 (FDA, 2018a).

A Área Crítica é definida como Classe 100 e é equivalente à ISO 5, recomendando que todas as ocorrências de crescimento microbiano sejam investigadas neste ambiente. Diferentemente da ISO e dos outros guias BPF, limita-se às especificações para o tamanho de partícula de 0,5 µm (FDA, 2018a).

Classifica, todas as demais classes como áreas de suporte, sendo estas Classe 1.000 (ISO 6), Classe 10.000 (ISO 7) e Classe 100.000 (ISO 8). Recomenda que as zonas imediatamente adjacentes à Área Crítica seja pelo menos de Classe 10.000 (FDA, 2018a).

Determina que devem ser estabelecidos e seguidos procedimentos para evitar contaminações microbianas em todos os ambientes classificados (YANG et al., 2013) devendo ser realizadas coletas microbiológicas ativas e passivas de ar, sendo os limites apresentados na tabela 2-4 (FDA, 2018a). Acrescenta que, quando apropriado, poderão ser estabelecidos limites de ação alternativos, dependendo da metodologia utilizada e do tipo da operação. Não se determinam os limites para a amostragem de superfície, apesar de descrever que este tipo de amostragem deve estar incluído no Monitoramento Ambiental (FDA, 2018a).

Tabela 2-4. Classificações do ar (Adaptado de FDA, 2018a).

Classificação de área (partículas de 0,5µm/ft³)	Designação ISO	≥ 0,5 µm Part/m³	Limite de ação para Ar ativo viável (UFC/m³)	Limite de ação para placas de sedimentação (UFC/4 horas)
100	5	3 520	1	1
1000	6	35 200	7	3
10 000	7	352 000	10	5
100 000	8	3 520 000	100	50

Apresenta orientações quanto à avaliação de tendência em monitoramento ambiental, quando exemplifica que áreas com baixo crescimento podem sofrer maior impacto da recuperação dos organismos do ambiente em virtude da limitação da técnica empregada. Por este motivo, adicionalmente aos valores numéricos, a avaliação de tendência deverá ser abordada como frequência de crescimento. Mesmo na ausência de tendências, determina que qualquer resultado cima dos limites deverá ser investigado (FDA, 2018a). O programa de determinação de limites e avaliação de tendência deverá estar baseado em um histórico da área. Para operações novas, podem ser utilizados os mesmos limites previamente determinados com base no histórico de áreas com processos similares. Os resultados devem ser tratados de maneira individual, ao invés de considerar uma média dos mesmos para não mascarar condições localizadas. O guia vai além, quando aborda a importância da avaliação de tendências quanto a mudanças significativas de microbiota ambiental (FDA, 2018a).

Ainda, é abrangente, ao permitir a implementação de métodos alternativos, como, por exemplo, métodos rápidos, desde que comprovada a equivalência ou superioridade em relação aos métodos tradicionais (FDA, 2018a).

2.5.2 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

A RDC 17/2010, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação, determina que “as áreas de produção onde estiverem sendo processados produtos susceptíveis à contaminação por microrganismos devem ser

monitoradas periodicamente, por exemplo, monitoramento microbiológico e material particulado” (BRASIL, 2010). Considerando que qualquer produto farmacêutico é susceptível à contaminação microbiológica, sendo esta potencialmente maior ou menor, então, estariam inclusos nesta categoria tanto medicamentos estéreis quanto os não-estéreis. Além disso, determina, no Art. 77, que “os responsáveis pela Produção, Controle e Garantia da Qualidade devem exercer em conjunto, determinadas atividades relativas à qualidade, tais como: monitoramento e controle do ambiente de fabricação; estabelecimento e monitoramento das condições de higiene” e que “o controle de qualidade tem como outras atribuições (...) participar do monitoramento ambiental” (BRASIL, 2010). Ainda, cita que, quando necessário, “devem existir procedimentos aprovados para monitoramento ambiental” e que “devem estar disponíveis procedimentos operacionais padrão e registros associados a ações adotadas relacionadas aos resultados obtidos de monitoramento ambiental” (BRASIL, 2010).

Assim sendo, é possível perceber que existe uma preocupação por parte da agência regulatória brasileira no que concerne o ambiente produtivo farmacêutico quanto à sua contaminação por microrganismos. Por se tratarem de medicamentos que, quando expostos à contaminação microbiana, apresentam a classe de maior risco ao paciente, existe uma seção específica nesta Resolução para regulamentar a produção de medicamentos estéreis. Neste contexto, determina que “os resultados de monitoramento ambiental devem ser avaliados em conjunto com os resultados do teste de esterilidade, para a liberação do produto final” (BRASIL, 2010).

Apresenta preocupação sobre o controle da normalidade do processo quando determina que limites de alerta e de ação para o monitoramento microbiológico e de partículas “devem ser estabelecidos (...) para o monitoramento de tendência da qualidade do ar das instalações” (BRASIL, 2010).

Ainda acerca da produção de medicamentos estéreis, classifica as áreas produtivas de acordo com os graus adotados pela maioria dos guias BPF (Classificação A, B, C, D) e apresenta os limites de contaminação aplicáveis para

cada caso no Anexo I desta resolução (tabelas 2-5 e 2-6). São consideradas duas situações diferentes para partículas não-viáveis: o ambiente em repouso e o ambiente em operação, podendo ser distintos os limites, já para viáveis, os limites são mantidos em ambos os casos (BRASIL, 2010).

Tabela 2-5. Limites para contaminação microbiológica, conforme anexo I da RDC 17/2010 (Adaptado de: BRASIL, 2010).

Graus	Amostra de ar (UFC/m ³)	Placas de sedimentação (diâmetro de 90mm) (UFC/4horas*)	Placas de contato (diâmetro de 55mm) (UFC/placa)	Teste de contato das luvas (5 dedos) (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-----
D	200	100	50	-----

* As placas de sedimentação podem ser expostas por menos de 4 horas.

Tabela 2-6. Sistema de classificação do ar para a produção de produtos estéreis, conforme anexo I da RDC 17/2010 (Adaptado de: BRASIL, 2010).

Grau	Em repouso		Em operação	
	Número máximo de partículas permitido m ³			
	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Não definido	Não definido

Considerando que a resolução RDC 17/2010 é bastante abrangente, mas ao mesmo tempo superficial quanto ao tema, em 2013 a ANVISA lançou o “Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica”. Neste guia, em que são feitas recomendações para fabricantes de medicamentos estéreis e não-estéreis, são abordados conceitos bastante utilizados, a importância da existência do Monitoramento Ambiental, além de fornecer diretrizes para a instalação de forma a se obterem os requerimentos necessários para áreas controladas.

Neste guia, define-se que “área limpa” e “área classificada” são termos que devem ser utilizados especificamente para instalações submetidas à

classificação e monitoramento quanto à contagem de partículas viáveis e não-viáveis (ANVISA, 2013).

Apesar de não ser o tema principal do Guia, determina que as áreas produtivas de medicamentos não-estéreis não necessitam da classificação de áreas, mas devem sempre ser mantidas como “áreas controladas” e projetadas de tal forma que atendam a grau D nas condições em repouso (at-rest condition) (ANVISA, 2013). Dessa maneira, o monitoramento dessas áreas se faz necessário para prevenir degradação e contaminação de produtos e deve ser criticamente considerado essencialmente quanto à susceptibilidade de contaminação dos medicamentos nelas fabricados, sendo a natureza, a periodicidade e a extensão do monitoramento determinados conforme análise de riscos (ANVISA, 2013).

Para a produção de não-estéreis, determina a necessidade de instalações projetadas, qualificadas e operadas de acordo com critérios rígidos de BPF, para prevenir a entrada de microrganismos nas áreas produtivas (ANVISA, 2013). Com a afirmativa de que “os micro-organismos (...) frequentemente estão associados com partículas de 10 a 20 μm ”, ressalta a complementariedade dos resultados de partículas viáveis e não-viáveis (ANVISA, 2013).

Afirma que a classificação de uma área limpa deve ser determinada de acordo com a quantidade de partículas não-viáveis e viáveis em duas diferentes condições de realização dos testes (“em operação” e “em repouso”). Por isso, cita, como base técnica adotada em território nacional para a classificação de áreas limpas, tanto as normas de Boas Práticas de Fabricação quanto a ISO 14644, de forma complementar, uma vez que esta não aborda a os limites microbianos aplicáveis para cada classificação de área e não apresenta diferentes limites para aplicação aos resultados nas condições “em repouso” e “em operação” (ANVISA, 2013).

Considera importante a avaliação da ocorrência de resultados microbianos frequentes para áreas limpas quando determina que este influenciará na frequência da reclassificação das áreas Grau A e B, sendo que, durante a classificação, deverão haver resultados de monitoramento

microbiológico nas situações “em repouso” e “em operação”. Acrescenta que é necessária a identificação microbiana durante a classificação das áreas, sendo avaliados em conjunto com os resultados numéricos obtidos (ANVISA, 2013). Os limites para cada classe de área classificada são apresentados na tabela 2-7.

Tabela 2-7. Limites recomendados para avaliação da contaminação microbiológica em áreas classificadas como graus A, B, C e D (Adaptado de: ANVISA, 2013).

Grau	Amostra de ar (UFC/m ³)	Placas (diâmetro de 90mm) (UFC/4horas)	Placas de contato (diâmetro de 55mm) (UFC/placa)	Impressão de luva de 5 dedos (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-----
D	200	100	50	-----

Não considera o monitoramento ambiental como uma medida direta de esterilidade de produtos, devido à variabilidade dos métodos e à falta de correlação direta entre os níveis de monitoramento ambiental e esterilidade de um lote, mas sim uma ferramenta para avaliar a eficácia das medidas de controle de contaminação, devendo ser avaliado durante a decisão de um lote ser liberado (ANVISA, 2013).

O estado de controle também é um ponto de destaque neste guia quando determina que o monitoramento “fornece dados do perfil microbiano (...) e dados que permitem identificar novas tendências de contagens microbianas e crescimento de uma microflora dentro das salas limpas ou ambientes controlados” (ANVISA, 2013).

2.5.3 União Europeia

A legislação europeia é baseada nos guias publicados no documento “The Rules Governing Medicinal Products in the European Union”, sendo o Guia de Boas Práticas de Fabricação abordado no volume 4 (“EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use”) (EUROPEAN, 2014b).

No capítulo 5 “Production”, aborda a importância do monitoramento ambiental, ao determinar que, “dependendo do risco de contaminação, (deve ser realizada) uma verificação da limpeza de superfícies de áreas que não tem contato com o produto e o monitoramento do ar dentro da manufatura e áreas adjacentes, de forma a demonstrar a efetividade das medidas de controle contra contaminação trazidas pelo ar ou transferência mecânica” (EUROPEAN, 2014A).

Especificamente para a produção de medicamentos estéreis, o Anexo 1 “Manufacture of Sterile Medicinal Products” determina as diretrizes a serem seguidas. O anexo não traz informações detalhadas sobre a metodologia de amostragem, mas referencia que devem ser seguidos outros documentos como padrões EN/ISO 14644-1 (EUROPEAN, 2014b), cujo escopo é específico para a utilização por nações europeias. Considerando que este guia não trata da contagem de partículas viáveis, outras fontes deverão ser utilizadas para implementar o programa de monitoramento ambiental.

A classificação de áreas segue a nomenclatura A, B, C e D é realizada de acordo com as características do ambiente e vestimenta requerida para cada operação, de modo a minimizar o risco de contaminação microbiana e de material particulado no produto que está sendo manipulado (EUROPEAN, 2014b).

É possível perceber que, apesar de mencionar a consulta à EN/ISO 14644-1 e determinar que a classificação de áreas a ser seguida deve estar em conformidade com o a mesma, a forma como o guia classifica as áreas assemelha-se aos demais guias BPF pesquisados e às diretrizes adotadas pelas Farmacopeias Internacional da OMS e Japonesa. Por esse motivo, o guia apresenta as correlações entre os limites adotados e a classificação ISO. Em relação ao material particulado, considera que o monitoramento ambiental de áreas limpas (classe A e B) deve ser realizado em condições “em repouso” e “em operação”, sendo os limites determinados em cada caso. Já EN/ISO 14644-1, não traz limites específicos para cada situação (EUROPEAN, 2014b).

Para limites microbianos, apenas apresenta os limites nas condições em operação, conforme tabela 2-8 (EUROPEAN, 2014b).

Tabela 2-8. Limites recomendados para monitoramento microbiológico de áreas limpas durante a operação (EUROPEAN, 2014b).

Limites recomendados de contaminação microbiológica				
Classe	Amostra de ar (UFC/m ³)	Placas de sedimentação (UFC/4horas)	Placas de contato (UFC/placa)	Teste de luvas 5 dedos (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-----
D	200	100	50	-----

Em 2017, o Conselho da União Europeia disponibilizou para consulta e comentários a nova versão do Anexo 1 (EUROPEAN, 2018). Avaliando as alterações mais relevantes, percebe-se a maior preocupação quanto à prevenção da contaminação do produto por microrganismos oriundos dos seres humanos. Como exemplos de requerimentos novos acerca dessa premissa, podemos citar a limitação à entrada de pessoas não treinadas, daquelas não estritamente necessárias à operação e das que tiveram contato com culturas celulares e/ou microrganismos que podem levar à contaminação do produto final. Além disso, explicita a importância do monitoramento do pessoal em regiões como braços e peito dos operadores, em adição às luvas (EUROPEAN, 2018).

Ainda a nova revisão, determinará que os limites em operação para classe D devem ser estabelecidos com base no histórico de resultados, uma vez que os mesmos não são trazidos neste documento. Por fim, grande ênfase se tem dado ao gerenciamento de riscos como forma de justificar muitas das decisões relacionadas à prevenção de contaminação (EUROPEAN, 2018).

2.6 ASPECTOS RELEVANTES DAS DIRETRIZES FARMACOPEICAS E REGULATÓRIAS

No quadro 2-1, é apresentada uma comparação entre os alguns critérios e conceitos encontrados ou não em cada um dos documentos consultados.

Por todos os aspectos mencionados, é possível perceber que o monitoramento ambiental durante o processo produtivo é uma preocupação

comum ao redor do mundo, sendo amplamente abordado em farmacopeias, normas, leis e guias de boas práticas de fabricação.

Após a harmonização das farmacopeias, era esperado que houvesse uma padronização nas classificações de áreas, requisitos, delineamento do programa de monitoramento ambiental e os limites aplicáveis. Entretanto, algumas informações ainda não são completamente equivalentes a respeito deste tema, sendo abordado com maiores detalhes em algumas farmacopeias do que em outras. Por exemplo, a Farmacopeia Internacional aborda, superficialmente, o monitoramento ambiental, apenas citando a necessidade da realização em alguns casos. Já a Farmacopeia Europeia, apesar de não apresentar informações sobre a classificação de áreas, cita a necessidade do controle ambiental nas áreas de produção assépticas, referenciando o Guia BPF da Comunidade Europeia a ser consultado. Assim sendo, para a União Europeia, as informações da Farmacopeia Europeia e do Guia BPF para produtos não-estéreis são complementares, visto que este não aborda metodologias para análise microbiológica e aquela faz referência ao guia adotado pela União.

Tanto a Farmacopeia Americana (USP) quanto a Farmacopeia Brasileira seguem a classificação ISO para ambientes controlados, e, assim como esta norma base, pouco determina a respeito da contagem microbiana em áreas classificadas, abordando a qualidade microbiológica como importante, porém sem apresentar limites (PINTO *et al.*, 2015). Apesar desta semelhança, a Farmacopeia Brasileira faz muitas considerações a respeito do Programa de Monitoramento Ambiental, determinação de pontos e frequência de amostragem.

A Farmacopeia Americana apresenta um novo paradigma sobre a avaliação de tendências microbianas aplicadas a monitoramento ambiental, a qual não é tratada em nenhum outro documento oficial (BAR, 2015). Tendo em vista as limitações das técnicas de amostragem, classifica os resultados obtidos como ocorrências de contaminação e não simplesmente como resultados numéricos (BAR, 2015; UNITED, 2018d). Por isso, os limites são apresentados como porcentagem de recuperação de contaminações e, especificamente para a área crítica, classificada como ISO 5, apresenta um valor numérico absoluto

de contagem microbiana, o qual denomina “excursões significativas” (UNITED, 2018d).

Dentre as Farmacopeias consultadas, somente a Japonesa baseia-se na classificação de áreas comumente adotada pelos Guias de Boas Práticas de Fabricação. Entretanto, ao comparar a classificação e os limites adotados na situação “em operação” com a ISO 14644-1, existe uma diferença aos demais guias BPF, sendo as classes A, B e C equivalentes às ISO 5, 7 e 8, ao passo que, para os guias, normalmente encontra-se a equivalência das classes A, B, C e D às ISO 4,8 (ou ISO 5), ISO 5, ISO 7 e ISO 8, respectivamente.

A regulamentação brasileira, a respeito do monitoramento das áreas produtivas, baseia-se na RDC 17/2010 sobre as Boas Práticas de Fabricação, a qual aborda o tema de maneira superficial, sendo complementada pela norma ISO-14644-1 e pelo Guia da Qualidade do Ar, publicado pela própria ANVISA. Este guia demonstrou-se um dos documentos oficiais mais completos a respeito do tema, abordando, inclusive, as aplicações para áreas produtivas farmacêuticas não-estéreis, apesar de pouco detalhado.

A Norma ISO, bem como a Farmacopeia Brasileira, apresenta maior gama de tamanho de partículas, apresentando-os de forma cumulativa.

A necessidade de identificação microbiana é abordada em detalhes nas Farmacopeias Americana, Brasileira e Japonesa, no Guia BPF da FDA e no Guia da Qualidade do Ar da ANVISA, especialmente em excursões dos limites, devendo ser parte integrante das boas práticas de fabricação (SANDLE, 2011). Além disso, é auxiliar na avaliação de tendências e para avaliação da efetividade do programa de sanitização (SANDLE, 2011, EUROPEAN, 2014b, UNITED, 2018d, JAPANESE, 2011).

Tanto os documentos regulatórios quanto nos compêndios consultados, pouco descrevem o controle microbiano da produção de medicamentos não-estéreis, sendo citado apenas pelas Farmacopeias Americana e Brasileira, pela RDC 17/2010 da ANVISA e pelo “Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica”, publicado, também pela ANVISA. Este último é o documento que descreve os

maiores detalhes a este respeito ao determinar que a produção deverá ocorrer em áreas que atendam aos requerimentos da classe D, porém, não necessitando de classificação de áreas.

Quadro 2-1. Resumo dos pontos principais encontrados em cada um dos documentos consultados.

Abrangência	Internacional		União Europeia		Estados Unidos		Japão	Brasil		
Documento Questão	IntPh	ISSO	EUPh	EU GMP	USP	FDA GMP	JP	FB	RDC 17/10	Guia ANVISA
1. Sistema de classificação de áreas limpas. (Equivalência aproximada entre os diferentes documentos. Classes apresentadas de forma decrescente de criticidade)	N/A	ISO classe 1 ISO classe 2 ISO classe 3 ISO classe 4 ----- ISO classe 5 ISO classe 6 ISO classe 7 ISO classe 8 ISO classe 9	N/A	----- ----- ----- ----- Grau A Grau B ----- Grau C Grau D -----	----- ----- ----- ----- ----- ISO classe 5 ISO classe 6 ISO classe 7 ISO classe 8 -----	----- ----- ----- ----- ----- ----- Classe 1.000 Classe 10.000 Classe 100.000 -----	----- ----- ----- ----- ----- ----- Grau A ----- Grau B ----- Grau C ----- Grau D -----	ISO classe 1 ISO classe 2 ISO classe 3 ISO classe 4 ----- ISO classe 5 ISO classe 6 ISO classe 7 ISO classe 8 ISO classe 9	----- ----- ----- ----- ----- ----- Grau A Grau B ----- Grau C Grau D -----	----- ----- ----- ----- ----- ----- Grau A Grau B ----- Grau C Grau D -----
2. Considera diferentes limites para partículas nas condições "em repouso" e "em operação"?	N/A	Não	N/A	Sim. Exceto para classe A, sendo 100 vezes maior para condição "em operação".	Não	Não	Somente para partículas em suspensão. Não difere as condições para limites de partículas viáveis.	Não. Somente "em operação".	Sim. Exceto para classe A, sendo 100 vezes maior para condição "em operação".	Sim
3. Limites microbianos são apresentados?	N/A	Não	N/A	Sim, para Ar ativo, Superfície, Ar passivo e Toque de luva. Considera contagens em UFC.	Sim. Considera como porcentagem de recuperação de crescimentos dos pontos de amostragens em determinada área.	Sim. Para ar ativo e passivo. Considera contagens em UFC.	Sim, para Ar ativo, Ar passivo e Superfície (toque de luva e equipamentos/ instalações). Considera contagens em UFC.	Não	Sim	Sim
4. Aborda avaliação de tendência microbiana?	N/A	Não	N/A	N/A	Sim. Feita com relação à porcentagem de recuperação devido às limitações das técnicas. Excursões significativas apenas para ISO 5. Avaliações de tendências conforme metodologia do controle de qualidade	Sim. Quanto aos resultados e aos tipos de microrganismos encontrados.	Sim. Sugere a plotagem em control chart e determinação de limites.	Sim	Não	Sim
5. Delineamento do Programa de Monitoramento Microbiológico Ambiental?	N/A	Não	Apenas cita.	Sim. Pontos de amostragem e frequência.	Sim. Pontos de amostragem e frequência.	Sim. Pontos de amostragem e frequência.	Sim. Direciona a decisão quanto a pontos de amostragem e frequência.	Sim. Pontos de amostragem e frequência.	Apenas cita.	Sim
6. Aborda identificação microbiana?	N/A	Não	Não	Não	Sim. Prioritária para ISO classes 5 e 6.	Sim. Igualmente importante para todas as classes por auxiliar na avaliação de tendências.	Sim, principalmente para Graus A e B.	Sim	Não	Sim
7. Aborda o Monitoramento Microbiológico Ambiental para produtos não-estéreis?	Apenas cita.	Não	Não	Não	Sim. Produção não-estéril não requer área classificada. Monitoramento ambiental como informativo das condições higiênicas	N/A	Não	Sim. Cita como forma de reduzir os testes requeridos na liberação.	Sim, de forma superficial.	Sim

2.7 CONCLUSÃO

Diante dos aspectos mencionados, é possível perceber que o monitoramento ambiental das áreas produtivas farmacêuticas é de grande interesse mundial seja na esfera regulatória ou compendial e que diversas instituições têm trabalhado para definir diretrizes a serem seguidas de forma a prevenir a contaminação microbiana do produto final. Há uma infinidade de informações já consolidadas a respeito do controle microbiano em áreas produtivas assépticas. No que concerne a produção não-estéril, entretanto, ainda se carece de informações e diretrizes específicas, haja vista as particularidades dos processos envolvidos e a sua menor criticidade quando comparada à manufatura de produtos estéreis. É necessário que sejam reunidos esforços por parte das agências regulatórias e contribuintes dos compêndios oficiais em busca da harmonização das práticas ao redor do mundo, mas também de maneira a servir como base para abordagens durante auditoria.

3 ISOLADOS MICROBIANOS PROVENIENTES DO AMBIENTE FARMACÊUTICO

A informação contida nesse capítulo foi parcialmente submetida para publicação no periódico Applied and Environmental Microbiology (conceito Qualis 2018: A1).

3.1 MICROBIOTA AMBIENTAL

O monitoramento microbiológico do ambiente de produção é uma ferramenta útil para a avaliação da estratégia de controle microbiano baseado no risco. A implementação de um programa de monitoramento ambiental de acordo com o risco de contaminação do produto pode ajudar a confirmar a eficácia dos controles microbiológicos e facilitar a detecção precoce de possíveis problemas (UNITED, 2018c).

Além dos níveis de biocarga presentes no ambiente de produção, o conhecimento dos microrganismos presentes na microbiota ambiental também exerce importante papel na determinação do gerenciamento de riscos (UNITED, 2018c), uma vez que representam melhor o grupo de microrganismos que, potencialmente, poderá contaminar os produtos. Adicionalmente, o conhecimento do perfil microbiano funcionará como base para a avaliação de potenciais microrganismos indesejáveis e/ou patogênicos no produto, de acordo com a sua forma de administração, pacientes-alvo e características físico-químicas (UNITED, 2018c).

O teste de promoção de crescimento, a que são submetidos os meios de cultura, é realizado como forma de verificar se os mesmos são capazes de recuperar adequadamente os microrganismos de interesse. Neste sentido e como parte da estratégia de controle, as Farmacopeias Brasileira e Americana recomendam que, além dos microrganismos compendiais indicados pelo fabricante, sejam utilizados isolados ambientais para promoção do crescimento de meios de cultura utilizados nas análises de rotina do controle microbiológico (UNITED, 2018c; UNITED, 2018e; FARMACOPEIA, 2010). De maneira semelhante, recomenda-se o uso de microrganismos isolados localmente durante a validação de métodos microbiológicos convencionais e alternativos (EUROPEAN, 2018a, FARMACOPEIA, 2010) nas indústrias farmacêuticas, de forma a demonstrar que as metodologias implementadas são capazes de detectar os microrganismos a que os produtos serão, potencialmente, expostos (UNITED, 2018c).

A escolha dos desinfetantes e sanitizantes que serão utilizados na produção, seja rotineiramente ou em casos de excursões, também dependerá das características da microbiota ambiental. O capítulo 1072 da USP 41 aborda que o teste de eficácia de sanitizantes deverá abranger, além de microrganismos farmacopeicos, os isolados ambientais mais prevalentes para a execução dos testes, com o objetivo de se confirmar sua susceptibilidade, uma vez que existem diferenças de resistência entre espécies e variedades. Os desafios preconizados neste capítulo contemplam:

(1) teste uso-diluição, que desafia desinfetantes preparados a várias concentrações e tempos de contato, na busca da combinação mais adequada, e

(2) teste de desafio de superfície, que se baseia no espalhamento dos microrganismos selecionados a superfícies constituídas de cada um dos materiais presentes na produção e, em seguida, a aplicação do desinfetante, utilizando a concentração e o tempo de contato determinado no teste uso-diluição (UNITED, 2018g).

Destacando-se a importância da avaliação do perfil microbiano local, Bartnett et al. (2017) exemplificam que a aplicação de dados de Monitoramento ambiental pode ser útil na manutenção de ambientes críticos como parte da escolha racional dos microrganismos para os testes desafio. Por exemplo, para o teste de eficácia de um fungicida para certificação pela Agência Americana de Proteção Ambiental (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) se requer o uso do bolor *Trichophyton mentagrophytes*. Contudo, um teste satisfatório para esta espécie não significa que seja letal contra todos os fungos. É sabido que *T. mentagrophytes* é muito menos resistente que *Aspergillus brasiliensis*, que, inclusive, é muito mais provável de ser encontrado nos ambientes de manufatura (BARTNETT et al., 2017). Dessa maneira, é razoável que se inclua *A. brasiliensis* nos testes de eficácia de sanitizantes, de forma a garantir a manutenção do estado de controle. O capítulo 1072 da USP traz exemplos dos microrganismos que devem ser utilizados nos testes de desafio de acordo com a Organização Americana de Químicos (American Organization of Analytical Chemists, AOAC), além de uma lista dos isolados ambientais tipicamente utilizados para cada um dos sanitizantes (UNITED, 2018g).

A USP 41 determina que um programa de Monitoramento ambiental de sucesso inclui um nível apropriado de identificação da microbiota como forma de avaliar a efetividade dos procedimentos de limpeza e sanitização, dos métodos de análise e da sua recuperação. Ainda, as informações obtidas por um programa de identificação pode ser útil na avaliação de tendências e investigação de fontes de contaminação, especialmente quando os níveis recomendados são excedidos (UNITED, 2018d).

Atualmente, na maioria das avaliações de áreas higiênicas não-estéreis, a caracterização microbiana tem se limitado às observações quanto à morfologia celular, coloração de Gram e testes diagnósticos simples (UNITED, 2018c), o que pode levar a perda de informações valiosas.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF

A técnica MALDI-TOF MS (*Mass Spectroscopy Matrix-Assisted Laser Dissorption – Time of Flight*) consiste em gerar impressões digitais proteicas de todas as células e compará-las com uma base de dados com a utilização de algoritmos. A identificação microbiana por espectrometria de massas foi inicialmente descrita por Anhalt e Feneslau em 1975 ao quais, no ano de 1980, desenvolveram a metodologia de MALDI-TOF como é conhecida hoje. Estes estudos possibilitaram o reconhecimento de biomoléculas relativamente grandes, incluindo as ribossomais (WEISER et al., 2012). O primeiro artigo publicado a respeito da sua utilização na rotina clínica ocorreu apenas em 2009, após a disponibilização comercial de equipamentos (SENG et al., 2009).

Pelo intenso uso em microbiologia clínica, as bibliotecas proteômicas de MALDI-TOF MS são bastante voltadas para este setor. Assim sendo, quando aplicadas à microbiologia ambiental, as bases de dados são relativamente limitadas (BIZZINI et al., 2010). Diferenças taxonômicas e, em alguns casos, baixa discriminação do espectro obtido pelo MALDI-TOF podem ocorrer, por exemplo quando se comparam microrganismos com grande similaridade genômica como *E. coli* e *Shigella ssp.*(BIZZINI et al., 2010). Por outro lado, a identificação convencional também pode levar a resultados discrepantes devido

a erros durante os testes fenotípicos (BIZZINI et al., 2010). Por este motivo, considerando as limitações de ambas as técnicas, a identificação por MALDI-TOF é bem aceita em substituição a testes fenotípicos. Bizzini *et al.* constataram que as discrepâncias de resultados em nível de espécies, porém, idênticas quanto ao nível de gênero foi de 5,3% e as discrepâncias de identificação entre uma técnica e outra foi de apenas 1,5%. Ainda, alguns autores descreveram que o nível de assertividade entre uma técnica e outra é bastante alto, tendo sido calculado como 84% por Seng *et al.*, e 93,2% por Bizzini et al.. (SENG et al., 2009; BIZZINI et al., 2010).

A técnica é vantajosa aos testes fenotípicos por ser bastante simples de modo geral, uma vez que é possível realizar a aplicação direta da colônia no equipamento (WEISER et al., 2012; BIZZINI et al., 2010). Exceções se fazem presentes quando é requerida fase de extração após não ser obtido um teste conclusivo com aplicação direta, uma vez que esta etapa é um pouco mais trabalhosa (BIZZINI et al., 2010).

Além disso, Bizzini et al. demonstrou que o sucesso da identificação depende da pureza da colônia submetida ao teste, uma vez que foi avaliada mistura de bactérias e não foi obtido resultado satisfatório, sendo inconclusivo ou identificada apenas um dos microrganismos. Por este motivo, a etapa inicial de isolamento é de suma importância (BIZZINI et al., 2010).

No caso de MALDI-TOF MS, a utilização de meios ricos para a recuperação e/ou isolamento aumenta a correlação com testes fenotípicos, uma vez que o microrganismo é capaz de uma gama maior das proteínas de seu genoma, ao passo que um meio seletivo, cujas condições de crescimento são mais pobres, impediria uma expressão significativa dos genes, dificultando a identificação dos mesmos pelo método direto. Com a realização da etapa de extração, não se nota diferenças entre os dois tipos de meios. (BIZZINI et al., 2010). Microrganismos ambientais normalmente são cultivados em meio de cultura o TSA (Tryptic Soy Agar), um meio de cultura geral para a recuperação de microrganismos, rico em nutrientes e não específico, de forma a recuperar o maior espectro de microrganismos. Dessa maneira, estes tipos de amostras são bons candidatos para a identificação direta.

Em contrapartida, o uso da técnica para a identificação de fungos é um pouco limitado, uma vez que apenas fungos cultiváveis podem ser submetidos ao MALDI-TOF, sendo difícil a aplicação de algumas formas de bolores, como micélio e conídio (WEISER, 2012). Por este motivo, muitas vezes a metodologia convencional de identificação por morfologia é a mais utilizada. Neste caso, o cenário se inverte, pois, meios de cultura gerais e ricos em nutrientes não provêm as condições ideais para a diferenciação dos órgãos sexuais no micélio, dificultando a identificação. Como consequência, muitos dos resultados são liberados como *Mycelia sterilia*, ou seja, um micélio estéril.

3.3 OBJETIVO

Esse estudo teve como objetivo a caracterização dos isolados microbianos obtidos de áreas produtivas não-estéreis, avaliando possíveis fontes de contaminação.

3.4 AQUISIÇÃO DOS DADOS

3.4.1 Local

As amostragens foram tomadas nas áreas produtivas dedicadas a produtos farmacêuticos sólidos orais de uma indústria farmacêutica localizada na cidade de São Paulo.

As salas contempladas neste estudo foram agrupadas de acordo com as operações semelhantes e são apresentadas na tabela 3-1. As amostragens rotineiras seguem o formato de programa monitor, sendo que a frequência para cada tipo de tomada de amostra é determinada de acordo com análise de risco, considerando a finalidade de cada área, com base no grau de exposição do produto ao ambiente e a sua susceptibilidade de contaminação.

Nas salas de processo, são realizados os três tipos de amostragem (ativa do ar, passiva do ar e superfície). A frequência é trimestral para superfície e mensal para ar ativo e passivo. Especialmente para a área de embalagem primária, aplica-se a frequência trimestral, uma vez que o produto final é menos suscetível à contaminação microbiana que intermediários de processo, cuja frequência é trimestral, uma vez que é menor a possibilidade de contaminação.

Para as áreas em que não são conduzidos processos produtivos, ou seja, as salas de armazenamento de materiais limpos e de lavagem, é realizada apenas amostragem ativa de ar, sendo a frequência de amostragem a cada três meses e a cada seis meses, respectivamente.

Durante o ano de 2016, para todos os pontos de amostragem, foi adotada a frequência mensal, com o objetivo de se obterem dados suficientes para caracterizar a microbiota do ambiente produtivo, avaliando a prevalência dos microrganismos frente à sazonalidade. Foram realizadas amostragens nas condições dinâmicas, ou seja, com equipamentos e operadores em suas funções normais, exceto para as salas indicadas como requeridas amostragens estritamente em condições estáticas, devido à alta taxa de liberação de partículas durante os processos ou por não ser uma área produtiva. Assim sendo, foram obtidas, ao menos, 12 amostragens de cada ponto incluído no Programa.

Tabela 3-1. Salas do ambiente produtivo de produtos farmacêuticos sólidos orais que foram incluídas neste estudo para o monitoramento ambiental.

Processo / atividade	Sala(s) envolvida(s)	Frequência de amostragem		
		Ar Ativo	Ar Passivo	Superfície
Separação de matéria-prima	CP1, CP2 e CP3	Mensal	Mensal	Trimestral
Granulação e mistura	MC, G1, G2 e G3	Mensal	Mensal	Trimestral
Compressão	C1 e C2	Mensal	Mensal	Trimestral
Encapsulamento	E	Mensal	Mensal	Trimestral
Revestimento	R1 e R2	Mensal	Mensal	Trimestral
Impressão/ Classificação	IC	Mensal	Mensal	Trimestral
Classificação de pesos de cápsulas	MC e IC	Mensal	Mensal	Trimestral
Emblistamento (embalagem primária)	EMB	Trimestral	Trimestral	Trimestral
Sala de armazenamento de materiais limpos	ML	Trimestral	-----	-----
Área de lavagem	AL	Semestral	-----	-----

A disposição das salas envolvidas no processo encontra-se representada na figura 3-1. As áreas foram identificadas como Almoxarifado Químico, Produção e Embalagem para facilitar o entendimento. O esquema apresentado não mantém as proporções da escala real.

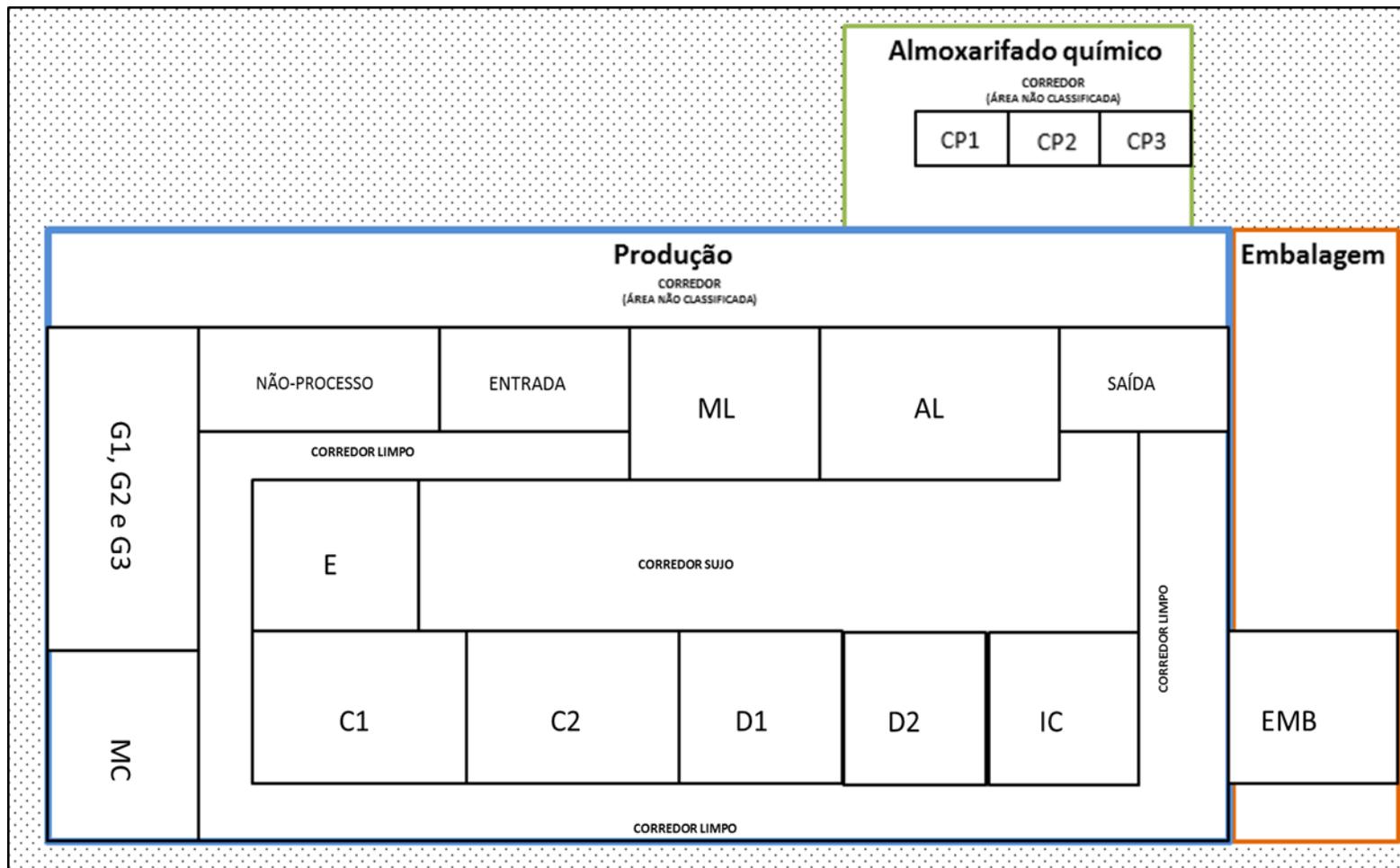


Figura 3-1: Esquema ilustrativo com a disposição no formato de planta baixa das salas incluídas neste estudo. As áreas foram divididas entre Almoarifado Químico, Produção e Embalagem.

3.4.2 Pontos de amostragem

Os pontos de amostragem estão representados nas figuras 3-2 a 3-10 e foram escolhidos de acordo com o seguinte racional:

- a.** Locais onde o ar capturado é representativo do ar ambiental que entrará em contato com o produto/matéria-prima, cuja exposição seja inerente ao processo.
- b.** Locais com alto grau de atividade e/ou trânsito de pessoas e/ou de difícil limpeza que possam ter impacto no produto acabado ou matérias-primas.
- c.** Os pontos selecionados representam os locais onde o risco ao produto é maior.

As superfícies selecionadas para amostragem não se referem à parte interna dos equipamentos de processo, mas sim locais dentro da área que representam 1) superfícies próximas àquelas em que o produto possa entrar em contato como parte do processo ou 2) superfícies representativas da área, conforme citado acima. A amostragem da superfície interna dos equipamentos, cujo contato com as matérias primas e o produto é mais íntimo, ocorre durante o monitoramento de limpeza de equipamentos, que não será tratado neste estudo.

Os pontos são identificados de acordo com a seguinte denominação:

T AX, sendo:

T: referência ao tipo de sala

A: tipo de amostragem: P, para ativa, PP, para passiva e SP, para superfície.

X: número do ponto, considerando que, em algumas salas, pode haver mais de um ponto para o mesmo tipo de amostragem.

Ex: Para a cabine de pesagem (CP) 1, ponto de amostragem de ar passivo número 1: CP1 PP01.

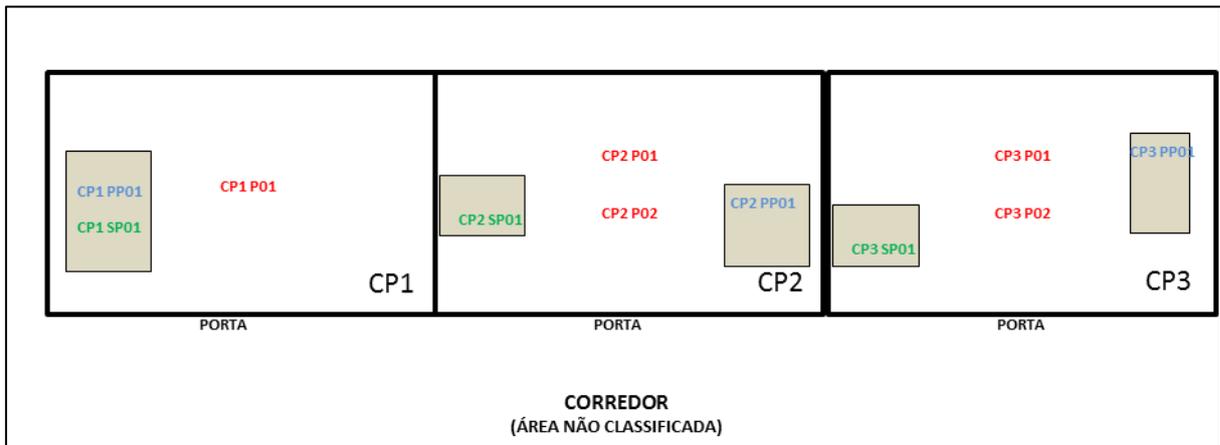


Figura 3-2. Localização dos pontos de amostragem nas cabines de pesagem (CP1, CP2 e CP3). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.

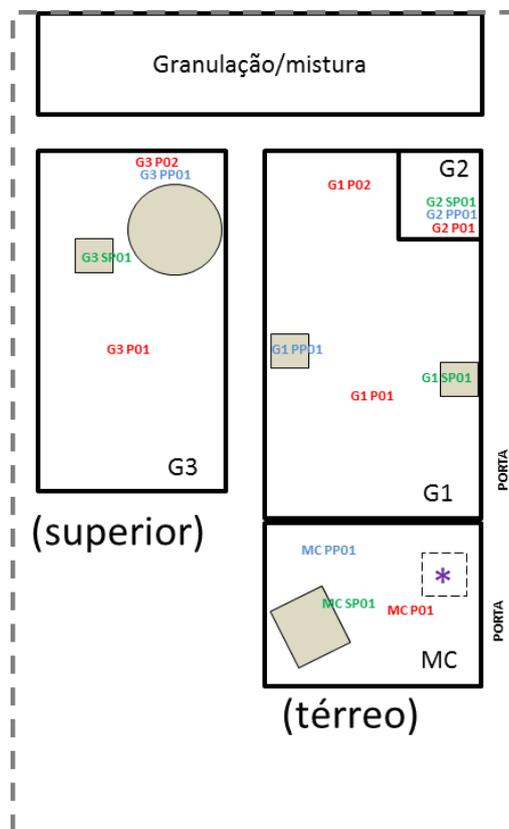


Figura 3-3. Localização dos pontos de amostragem na área para granulação (G1, G2 e G3) e mistura de pós (MC). Os pontos identificados em vermelho referem-

se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície. O asterisco indicado na sala MC representa a localização do equipamento móvel utilizado para a classificação de cápsulas por peso, o qual também poderá estar localizado na sala de impressão/classificação (IC).

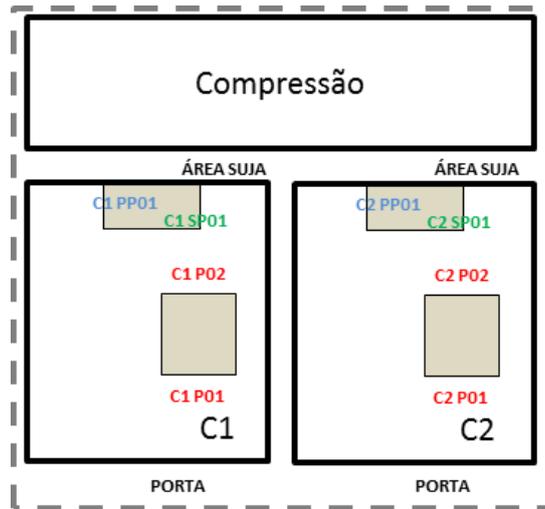


Figura 3-4. Localização dos pontos de amostragem nas salas de compressão (C1 e C2). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.

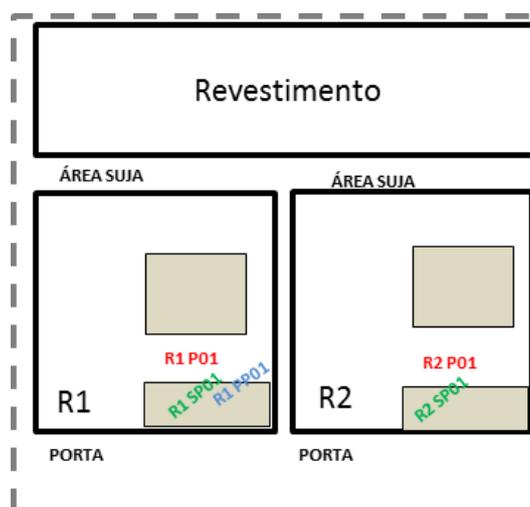


Figura 3-5. Localização dos pontos de amostragem nas salas de revestimento de comprimidos (R1 e R2). Os pontos identificados em vermelho referem-se à

amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.

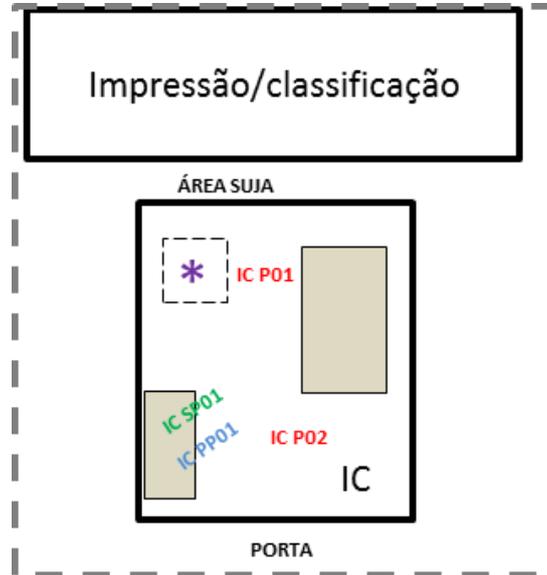


Figura 3-6. Localização dos pontos de amostragem na área de impressão e classificação (IC). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície. O asterisco representa a localização do equipamento móvel utilizado para a classificação de cápsulas por peso, o qual também poderá estar localizado na sala de mistura/classificação (MC).

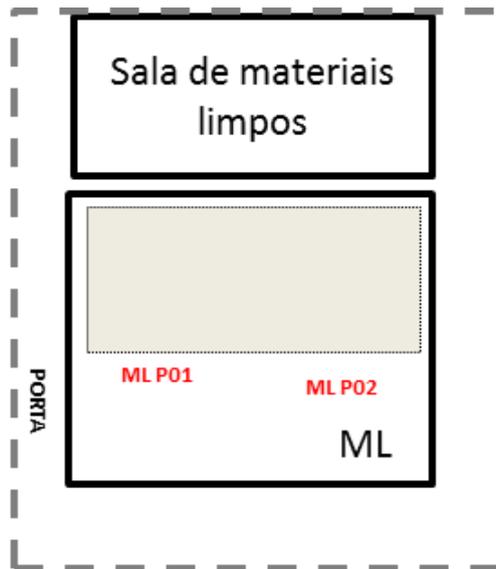


Figura 3-7. Localização dos pontos de amostragem na área de armazenamento de materiais limpos (ML). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar.

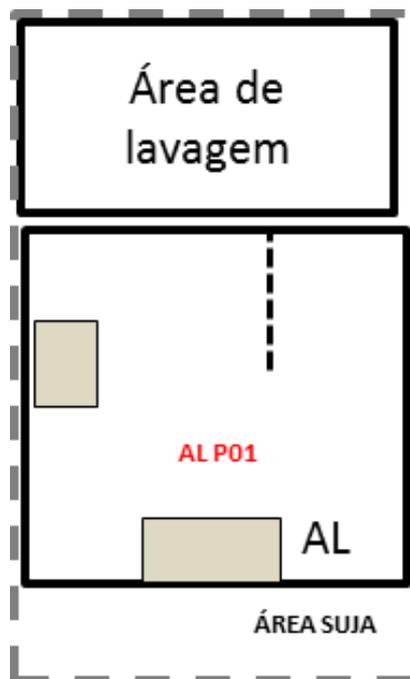


Figura 3-8. Localização do ponto de amostragem na sala de lavagem e limpeza dos equipamentos e materiais envolvidos no processo. O ponto identificado em vermelho refere-se à amostragem ativa de ar.

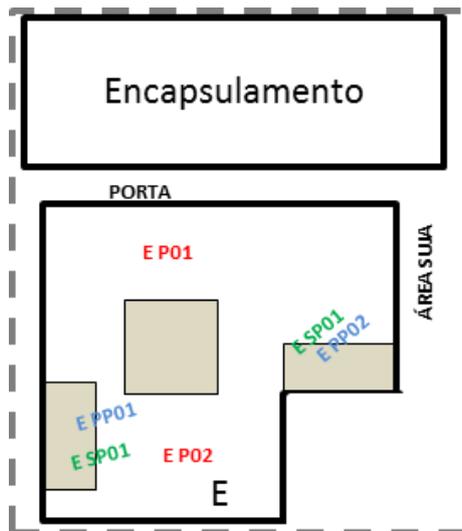


Figura 3-9. Localização dos pontos de amostragem na sala de encapsulamento (E). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.

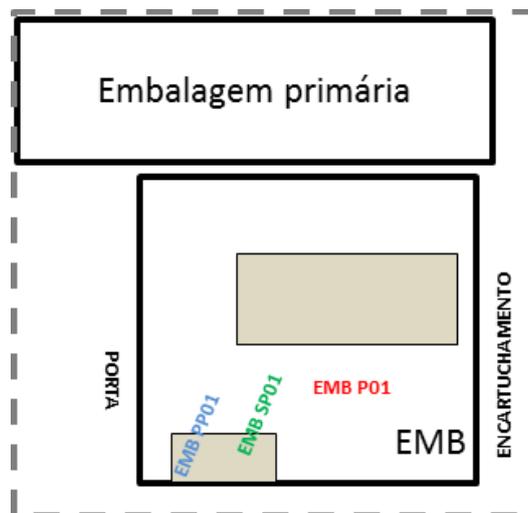


Figura 3-10. Localização dos pontos de amostragem nas salas de emblistamento (embalagem primária). Os pontos identificados em vermelho referem-se à amostragem ativa de ar, aqueles identificados em azul, à amostragem passiva de ar e em verde, à de superfície.

A figura 3-11 ordena as salas envolvidas no processo e incluídas no programa de monitoramento ambiental de acordo com o fluxo de processos, enfatizando as movimentações de produto, materiais e equipamento.

Produção e Embalagem

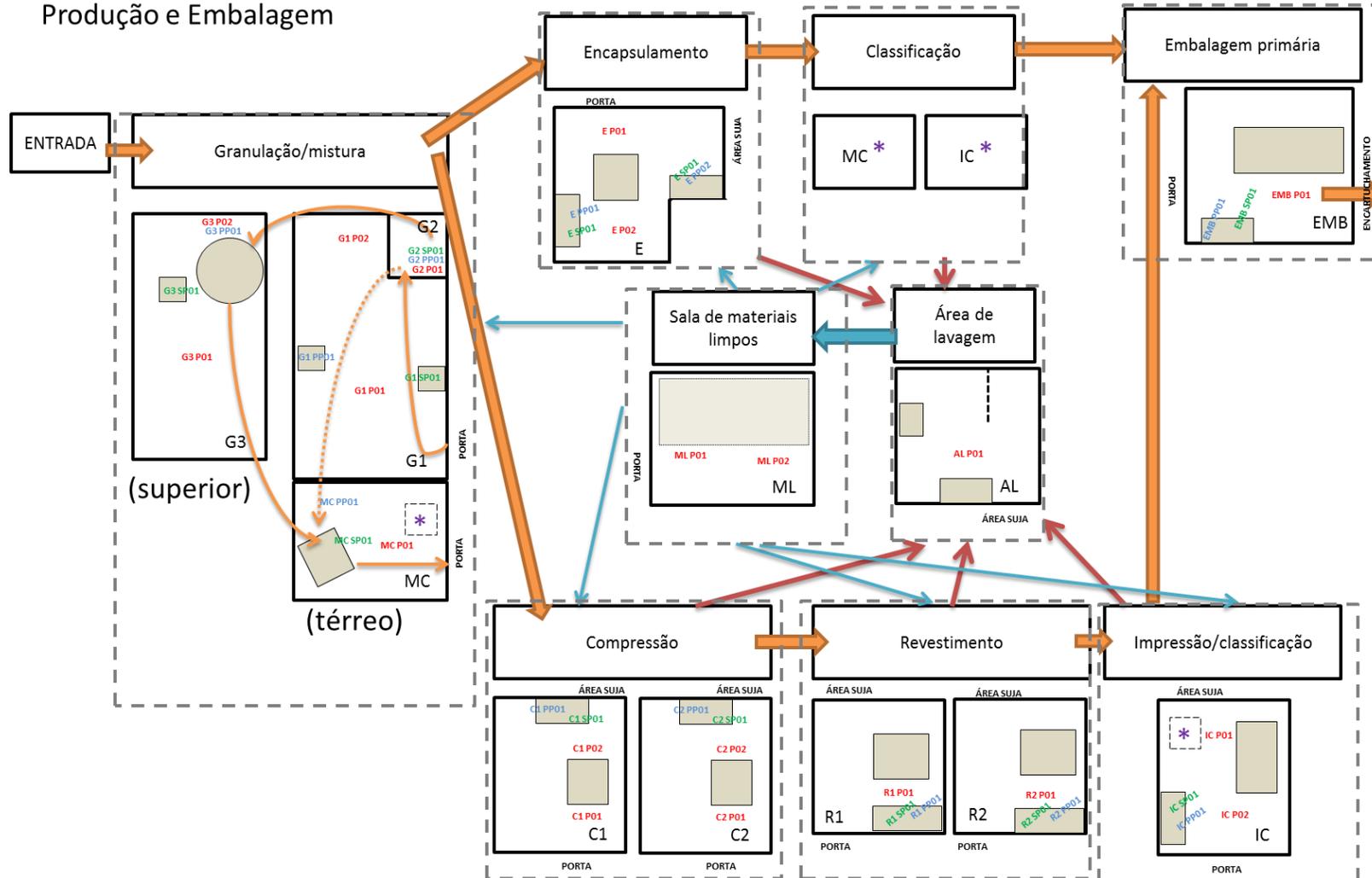


Figura 3-11. Esquema representativo do processo de produção e embalagem de cápsulas e comprimidos. As setas laranjas indicam o fluxo de matéria-prima e produto. As setas vermelhas indicam a movimentação de materiais e equipamentos sujos e as setas azuis,

de materiais e equipamentos limpos. Nota: O processo de classificação de cápsulas por peso é realizado em um equipamento móvel, representado pelo asterisco roxo, podendo ser realizado em ambas as salas MC e IC. Os pontos de amostragem destas salas também contemplam esta operação.

3.4.3 Materiais

3.4.3.1 Meios de cultura

Para a amostragem ativa de ar e de superfície, foram utilizadas placas Rodac®, constituídas de Ágar Caseína Soja (TSA), adicionada de polissorbato 80 e lecitina de soja, dimensões 60 x 10mm, fabricante Plast Labor;

Para a amostragem passiva de ar, foram utilizadas placas de Ágar Caseína Soja neutralizadas com polissorbato 80 e lecitina de soja, tamanho 90 x 15 mm, fabricante Plast Labor.

3.4.3.2 Sanitizante

Como solução sanitizante a ser aplicada durante amostragem, foi utilizado álcool isopropílico 70% em água, fabricante Sigma-Aldrich, referência: 563935, CAS: 67-63-0.

3.4.4 Equipamento

Para amostragem ativa de ar, foi utilizado o equipamento Air IDEAL 3P®, fabricante BioMérieux (figura 3-12). Seu mecanismo baseia-se na aspiração de um volume determinado de ar, levando à impactação das partículas presentes no ar ambiental sobre as placas contendo meio nutriente para determinação de partículas viáveis (BIOMÉRIEUX, 2010).

O equipamento opera com entrada de ar de 100 L/min e com velocidade de impactação < 20 m/seg, conforme norma ISO/DIS 14698-1 (BIOMÉRIEUX, 2010).



Figura 3-12: Equipamento Air IDEAL 3P ®, BioMérieux, utilizado para a amostragem de ar ativo (Retirado de BIOMÉRIEUX, 2018).

Antes de cada utilização, foi feita a inspeção do equipamento para verificar se o mesmo se encontrava em plenas condições de uso e, em seguida, a sua limpeza externa com pano de baixa liberação de partículas embebido em sanitizante (álcool isopropílico 70%).

Durante o período estudado, o equipamento passou por manutenções preventivas e calibrações com periodicidade controlada e não houve nenhuma manutenção corretiva.

3.4.5 Metodologia de amostragem

O responsável pela coleta, além de estar paramentado de acordo com as exigências de cada área, utilizou máscara para reduzir possíveis interferências na amostragem. Foi utilizada máscara semi-facial do tipo P3, pois, a entrada nas áreas durante processo requer a proteção respiratória contra partículas. A seguinte metodologia foi seguida para cada tipo de amostragem:

a) Ar ativo

- O equipamento é mantido em tripé apropriado à altura de trabalho (+/- 1m de altura do piso) e aproximadamente 1 m de distância dos equipamentos em processo.
- É realizada a sanitização da superfície externa do amostrador, incluindo o interior da tampa e o local de posicionamento da placa com pano de baixa liberação de partículas embebido em álcool isopropílico 70%.
- Em seguida, a cobertura do amostrador é removida segurando-a pela extremidade.
- A placa Rodac® contendo o meio de cultura é posicionada na fenda do aparelho, retirando a tampa superior de modo a não tocar no meio de cultura. A tampa é, então mantida sobre o pano embebido em álcool ou lenço umedecido, virada para baixo em superfície próxima.
- É colocada a cobertura perfurada do aparelho. A amostragem é iniciada e mantida por 5 minutos, equivalendo a 500 L de ar aspirado.
- Durante todo o processo de amostragem, o equipamento permanece na linha de visão do responsável, sendo que qualquer divergência verificada deve ser notificada.
- Ao término do período de amostragem, o responsável, após sanitizar a luva com álcool isopropílico 70%, remove a cobertura perfurada, coloca a tampa da placa e a remove da fenda. A placa é armazenada até envio ao laboratório.

b) Ar passivo

- O suporte, que provê a altura de trabalho/operação (+/- 1m de altura do piso), é posicionado no local de amostragem, distante, aproximadamente 1 m dos equipamentos em processo.

- A área superior do suporte é sanitizada com álcool isopropílico a 70% e depois com álcool isopropílico absoluto, aplicados em panos com baixa liberação de partículas ou lenço umedecido. Em seguida, a placa TSA é posicionada no suporte.
- A exposição é realizada pelo período de não mais que 4 horas ou de acordo com a duração do processo. Depois deste período, as placas são tampadas e armazenadas para envio ao laboratório. São registrados os períodos de exposição.

c) Superfície

- A tampa da placa Rodac® é removida e o meio de cultura ágar é pressionado levemente contra a superfície determinada por, aproximadamente, 5 segundos.
- Após a amostragem, a placa é tampada e armazenada para envio ao laboratório.
- A superfície que esteve em contato com a placa Rodac® é limpa com álcool isopropílico a 70% e, após, com álcool isopropílico absoluto para facilitar a secagem, aplicados com pano de baixa liberação de partículas ou lenço umedecido.

3.4.6 Transporte das amostras

Após a amostragem, as placas foram transportadas até o laboratório com a utilização de caixas térmicas previamente limpas com álcool isopropílico 70%.

3.4.7 Incubação

As placas amostradas foram incubadas a 20-25°C, no mínimo por 72 horas e, em seguida, a 30-35°C, no mínimo por 48 horas em incubadoras qualificadas nas faixas de operação e submetidas a programas de qualificação

e manutenção preventiva. Durante os períodos de incubação referentes às placas de monitoramento ambiental, não houve excursões significativas de temperatura.

3.4.8 Registro dos resultados

Os resultados foram registrados como segue:

a) Ar ativo viável

Os resultados lidos nas placas foram corrigidos de acordo com a tabela de correção disponível no manual do equipamento (Figura 3-13), a qual está relacionada com a probabilidade de uma partícula em suspensão ser aspirada e impactar a superfície do meio de cultura. É levado em conta a área perfurada, considerando as aberturas e as junções, bem como a probabilidade de mais de uma unidade formadora de colônia passarem pelo mesmo orifício e ocuparem o mesmo espaço na placa. Este fato contribui para que, quanto maior o número de UFC encontrado na placa, maior seja a correção. (BIOMERRIEUX, 2017).

Considerando que o volume de ar amostrado é de 500 L, o resultado corrigido é multiplicado por 2 (dois), para obter o resultado em 1000 L (1 m³). O resultado é então expresso em UFC/m³.

b) Ar passivo e superfície viável

A contagem de colônias obtida para ar passivo e superfície foi expressa diretamente, em UFC/placa.

Figura 3-13. Tabela de correção para contagem microbiana de ar ativo viável obtida com a utilização do equipamento Air IDEAL 3P, BioMérieux. (Adaptado de: BIOMERRIEUX, 2017).

Reading tables

CFU count	Corrected MPN																
1	1	31	32,902158	61	69,177312	91	111,217670	121	161,208491	151	222,874919	181	303,387386	211	419,601186	239	610,669016
2	2,003788	32	34,034636	62	70,476332	92	112,740659	122	163,048769	152	225,199481	182	306,542148	212	424,508594	240	620,861324
3	3,011392	33	35,171976	63	71,781750	93	114,272451	123	164,901916	153	227,544613	183	309,734919	213	429,508594	241	631,461324
4	4,022843	34	36,314217	64	73,093631	94	115,813148	124	166,768113	154	229,910685	184	312,966627	214	434,604748	242	642,502990
5	5,038168	35	37,461403	65	74,412039	95	117,362856	125	168,647546	155	232,298072	185	316,238232	215	439,800826	243	654,024729
6	6,057399	36	38,613577	66	75,737039	96	118,921679	126	170,540403	156	234,707163	186	319,550732	216	445,100826	244	666,070184
7	7,080565	37	39,770782	67	77,068698	97	120,489727	127	172,446878	157	237,138356	187	322,905162	217	450,508989	245	678,689231
8	8,107697	38	40,933063	68	78,407081	98	122,067108	128	174,367167	158	239,592059	188	326,302598	218	456,029823	246	691,939231
9	9,138825	39	42,100464	69	79,752259	99	123,653934	129	176,301474	159	242,068695	189	329,744156	219	461,668120	247	705,886600
10	10,173982	40	43,273030	70	81,104300	100	125,250320	130	178,250003	160	244,568695	190	333,230999	220	467,428990	248	720,608822
11	11,213197	41	44,450808	71	82,463274	101	126,856380	131	180,212966	161	247,092504	191	336,764332	221	473,317879	249	736,197057
12	12,256504	42	45,633844	72	83,829254	102	128,472234	132	182,190578	162	249,640581	192	340,345413	222	479,340606	250	752,759557
13	13,303935	43	46,822184	73	85,202311	103	130,098001	133	184,183059	163	252,213397	193	343,975550	223	485,503397	251	770,426224
14	14,355523	44	48,015878	74	86,582519	104	131,733803	134	186,190635	164	254,811436	194	347,656105	224	491,812921	252	789,354796
15	15,411300	45	49,214973	75	87,969954	105	133,379766	135	188,213536	165	257,435198	195	351,388500	225	498,276335	253	809,739411
16	16,471300	46	50,419519	76	89,364690	106	135,036016	136	190,251998	166	260,085198	196	355,174214	226	504,901335	254	831,822744
17	17,535557	47	51,629564	77	90,766807	107	136,702683	137	192,306261	167	262,761966	197	359,014794	227	511,696207	255	855,913653
18	18,604105	48	52,845161	78	92,176381	108	138,379898	138	194,376574	168	265,466048	198	362,911853	228	518,669891	256	882,413653
19	19,676979	49	54,066359	79	93,593494	109	140,067796	139	196,463188	169	268,198007	199	366,867077	229	525,832053	257	911,858098
20	20,754215	50	55,293211	80	95,018225	110	141,766514	140	198,566362	170	270,958423	200	370,882228	230	533,193165	258	944,983098
21	21,835848	51	56,525769	81	96,450657	111	143,476191	141	200,686362	171	273,747897	201	374,959151	231	540,764593	259	982,840241
22	22,921913	52	57,764087	82	97,890875	112	145,196971	142	202,823459	172	276,567046	202	379,099776	232	548,558711	260	1027,006907
23	24,012448	53	59,008218	83	99,338962	113	146,928997	143	204,977931	173	279,416508	203	383,306125	233	556,589014	261	1080,006907
24	25,107490	54	60,258218	84	100,795006	114	148,672418	144	207,150062	174	282,296943	204	387,580319	234	564,870264	262	1146,256907
25	26,207075	55	61,514142	85	102,259094	115	150,427385	145	209,340144	175	285,209031	205	391,924581	235	573,418651	263	1234,590241
26	27,311241	56	62,776047	86	103,731317	116	152,194051	146	211,548478	176	288,153475	206	396,341248	236	582,251984	264	1367,090241
27	28,420028	57	64,043990	87	105,211764	117	153,972575	147	213,775369	177	291,131003	207	400,832773	237	591,389915	265	1632,090241
28	29,533473	58	65,318028	88	106,700528	118	155,763115	148	216,021131	178	294,142367	208	405,401739	238	600,854201		
29	30,651617	59	66,598221	89	108,197703	119	157,565836	149	218,286089	179	297,188344	209	410,050862				
30	31,774498	60	67,884629	90	109,703385	120	159,380905	150	220,570571	180	300,269739	210	414,783004				

3.4.9 Limites aplicáveis

As áreas produtivas foram construídas seguindo os critérios de classificação ISO 8, conforme recomendação do guia da ANVISA (ANVISA, 2013), cuja contagem de partículas não-viáveis se relaciona à classificação D em guias BPF. Por esse motivo, como limites de ação para todas as salas avaliadas, foram adotados os valores descritos nos guias BPF e nas legislações vigentes para as áreas classificadas como D, sendo estes:

- Ar ativo: 200 UFC/m³
- Ar passivo: 100 UFC/placa
- Superfície: 50 UFC/placa.

Inicialmente, foram adotados os limites de alerta previamente determinados com base no histórico de resultados de cada área calculados a partir da equação 3-1.

Equação 3-1. Equação previamente usada para determinar cálculo dos limites de alerta.

$$\text{Limite de Alerta} = \bar{X} + 2S$$

Sendo \bar{X} a média aritmética e S o desvio padrão do conjunto de resultados do período avaliado.

Nos casos em que foram excedidos os limites, sejam de alerta ou de ação, foram realizadas 3 (três) reamostragens em dias úteis consecutivos à descoberta do resultado suspeito e as colônias recuperadas foram submetidas à identificação. Uma investigação acerca do resultado é conduzida apenas nos casos em que o limite de ação é excedido para qualquer um dos tipos de amostragem

3.4.10 Identificação microbiana

Todas as identificações das colônias representativas foram incluídas neste estudo. As ocorrências foram avaliadas por tipo de amostragem e a variação sazonal se deu pela comparação entre os períodos “seco”, para os meses de abril a setembro, e “chuvoso”, para os meses de outubro a março, de forma a compreender se o ambiente externo poderia exercer influências no ambiente produtivo controlado.

Os isolados microbianos foram tratados pelo número de ocorrências, ou seja, não foram consideradas as contagens absolutas das colônias recuperadas por placa, mas sim o(s) tipo(s) de microrganismo(s) encontrado(s) em cada ponto de amostragem, por determinada data de tomada de amostra.

A identificação microbiana foi realizada com o isolamento das colônias representativas de cada placa e, em seguida, com a submissão das mesmas à técnica de identificação. Sempre que foi possível obter resultados com grau de confiança adequado, os laudos foram emitidos em nível de espécie. A identificação de microrganismos da classe de fungos filamentosos ocorreu por morfologia comparativa. Já para a identificação de bactérias e leveduras, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas Matrix-Assisted Laser Desorption – Time of Flight (MALDI-TOF MS), recentemente aplicada para a identificação de isolados clínicos (BIZZINI et al., 2010).

3.4.1 Análise estatística

Foi utilizado software Excel®, para a construção dos gráficos de atributos.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Avaliação qualitativa: determinação da microbiota local

Durante o ano de 2016, foram enviadas para identificação um total de 1297 colônias representativas, as quais foram determinadas de acordo com as suas características macroscópicas, como cor, tamanho, formato, textura e aspecto da colônia. Destas, 937 referiram-se à amostragem ativa de ar, 299 à amostragem de superfície e 61 à amostragem passiva de ar.

Do total das identificações, 22 colônias (1,7%) de bactérias e 2 colônias (0,2%) de fungos não puderam ser identificados devido à incapacidade de multiplicação ou a resultados inconclusivos, sendo tratados como “cepa de microrganismo inerte” e “fungo não identificado”. Por não agregarem valor à avaliação, estes foram desconsiderados para o cálculo das ocorrências.

As ocorrências de identificações em mesma placa que resultaram em microrganismos de mesmo gênero, porém de espécies diferentes, foram consideradas ocorrências individuais.

Identificações de colônias em mesma placa que resultaram em mesmo gênero seguido de “sp.”, ou seja, nos casos em que não foi possível identificar a espécie do microrganismo, estas foram consideradas ocorrências diferentes, pois, não se pode afirmar que se tratem da mesma espécie de microrganismo. Assim sendo, foi considerado fator determinante para esta conclusão o critério de avaliação pelo laboratório microbiológico, o qual considerou tratarem-se de colônias representativas diferentes.

Colônias com morfologias diferentes em mesma placa cuja identificação resultou na mesma espécie foram consideradas identificações duplicadas, sendo tratadas como uma única ocorrência. Este fato pôde ser observado em 5,7% do total de identificações (74 colônias), sendo mais frequente nas amostragens ativas de ar (63 colônias, 6,7%) seguido das amostras de superfície (11 colônias, 3,7%) e não ocorrendo em amostras de ar passivo. Ambas as amostragens de ar ativo e de superfície se dão com o uso de placas Rodac®. A amostragem de ar ativo é realizada por impactação das partículas viáveis em suspensão no ar,

as quais passam por orifícios com tamanho e espaçamento padronizados. Após a amostragem, são formadas leves depressões, conforme imagem a seguir, devido à impactação do ar (figura 3-14), sem comprometer a viabilidade do meio. A presença destas depressões é capaz de interferir no desenvolvimento macroscópico das colônias, levando à formação de aglomerados distintos derivados de mesma espécie de microrganismo. Este é um dos aspectos desta técnica que pode ter contribuído para a maior ocorrência de identificações duplicadas neste tipo de amostragem.

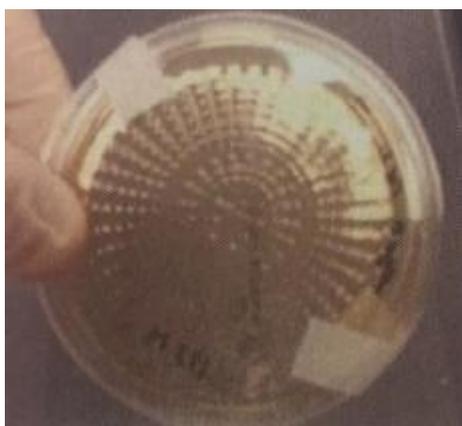


Figura 3-14. Exemplo de placa microbiológica marcada pela impactação do ar durante amostragem ativa.

A seguir serão apresentados os gráficos obtidos com a avaliação da ocorrência e prevalência dos microrganismos, divididos por gênero, considerando o tipo de amostragem e sazonalidade (gráficos 3-1 a 3-3).

As recuperações em ar ativo, além de apresentarem maior volume de colônias representativas, ainda, representaram a maior variedade de gêneros, contando com 70 tipos diferentes. Em comparação, para superfície, foram recuperados 48 gêneros diferentes e apenas 18 para ar passivo. Para os três tipos de amostragem, os microrganismos mais prevalentes foram os de gênero *Micrococcus* e *Staphylococcus*, naturalmente presentes na microbiota da pele humana, seguidos dos microrganismos comumente encontrados no ambiente como representantes da classe dos fungos (*Mycelia sterilia*, *Cladosporium* e *Penicillium*) e, em menor grau, das bactérias do gênero *Bacillus*. Especificamente para as amostragens de superfície, foi possível perceber um aumento nas recuperações, principalmente, de microrganismos aquáticos como

os de gênero *Sphingomonas*, *Microbacterium* e *Methylobacterium*. Os gráficos 3-1 a 3-3 trazem os gêneros que representam 90% de todos os organismos recuperados por ar ativo e superfície e 85% para ar passivo, devido ao fato de que os demais resultados apresentaram, igualmente, apenas uma ocorrência, inviabilizando a inclusão de todos os achados no gráfico. Em todos eles, é realizada uma comparação entre as recuperações obtidas quando avaliado todo o período e entre as duas variações sazonais “período seco” e período chuvoso”.

A análise dos gráficos em conjunto nos mostra que, apesar de existir um ambiente controlado para o processo, existe certa influência do ambiente externo no perfil de recuperações, o que pode ser decorrente da passagem de partículas viáveis pelas barreiras de entrada nas áreas ou pelo seu carreamento pelos operadores e/ou materiais e equipamentos de manutenção. Considerando a classe dos fungos, o gênero *Cladosporium* aparece predominantemente no período seco para os três tipos de amostragem, enquanto que o gênero *Penicillium* é encontrado predominantemente no período seco para as amostragens de ar ativo e de superfície e no período chuvoso para ar passivo. Ainda, foi possível perceber que o período chuvoso apresenta, de maneira geral, um aumento na recuperação das bactérias comumente encontradas. Ao serem avaliados os resultados individualmente por período, é possível afirmar que as ocorrências são bastante semelhantes entre os períodos chuvoso e seco, como é possível visualizar nas figuras 3-15 a 13-17. Foram considerados para avaliação os gêneros que representam, aproximadamente, 80% das identificações. Os demais gêneros foram incluídos na categoria “outros”.

Gráfico 3-1. Microrganismos recuperados pela amostragem de ar ativo, classificados por gênero e divididos pelo período em que foram recuperados: chuvoso (outubro a março) ou seco (abril a setembro).

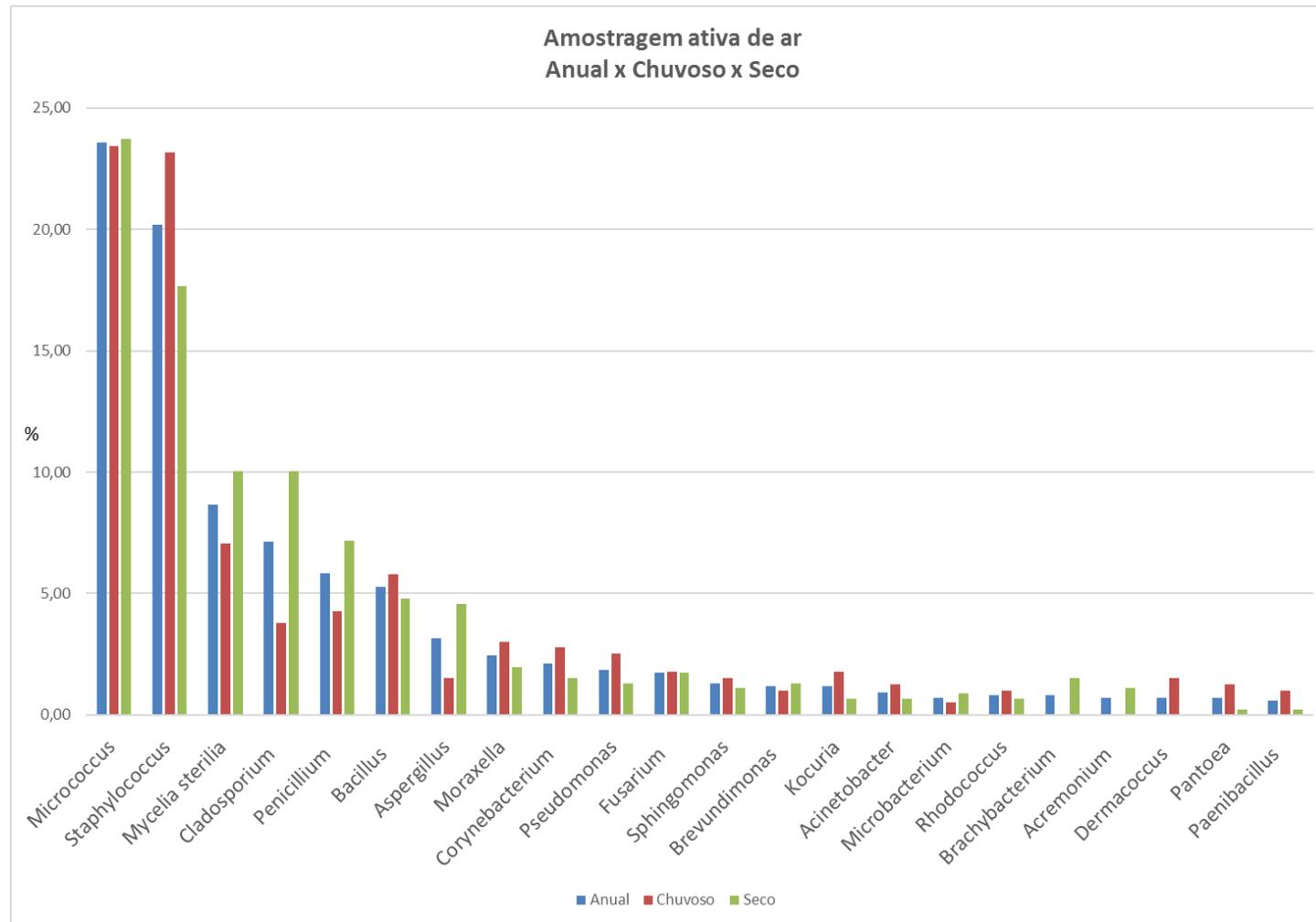


Gráfico 3-2. Microrganismos recuperados pela amostragem de ar passivo, classificados por gênero e divididos pelo período em que foram recuperados: chuvoso (outubro a março) ou seco (abril a setembro).

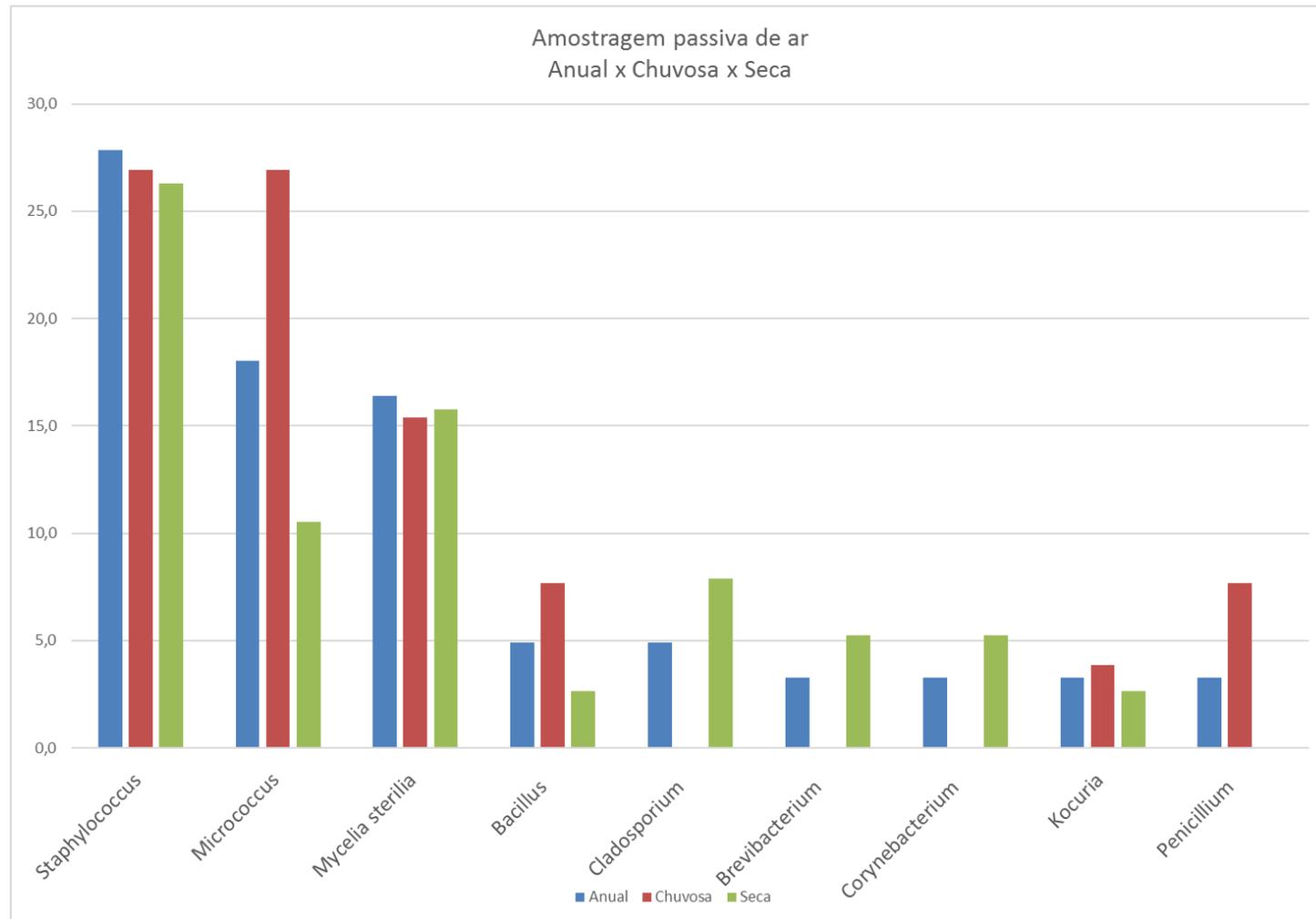
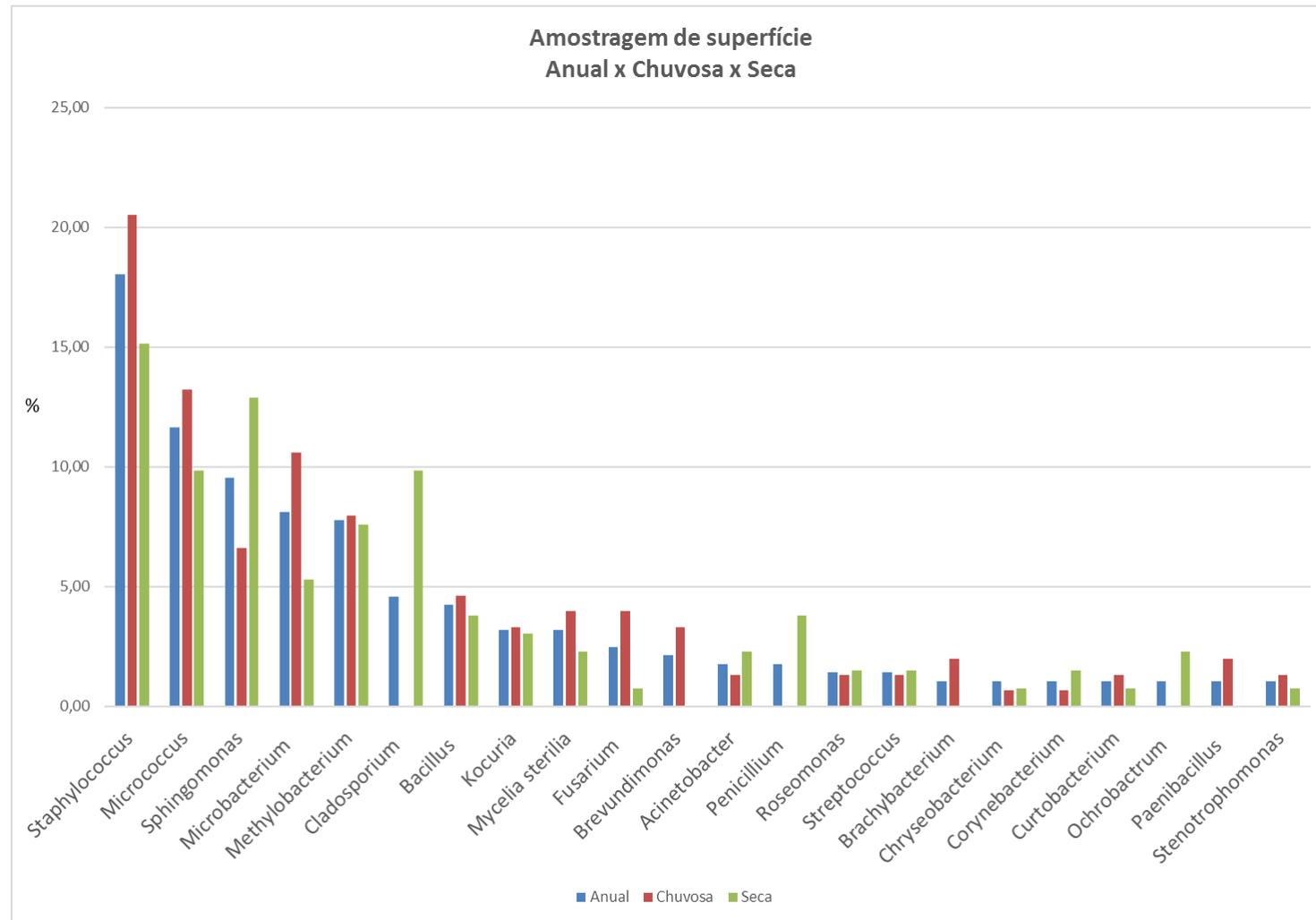


Gráfico 3-3. Microorganismos recuperados pela amostragem de superfície, classificados por gênero e divididos pelo período em que foram recuperados: chuvoso (outubro a março) ou seco (abril a setembro).



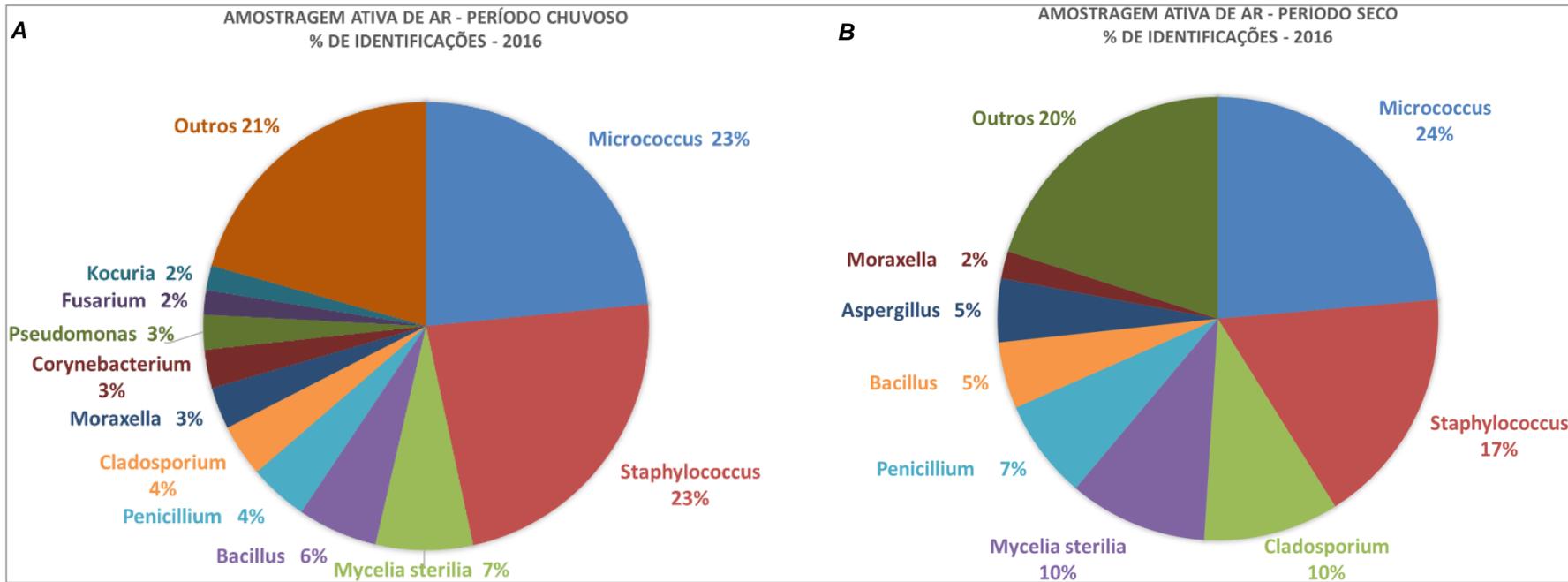


Figura 3-15. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar ativo durante o período chuvoso (A) e seco (B).

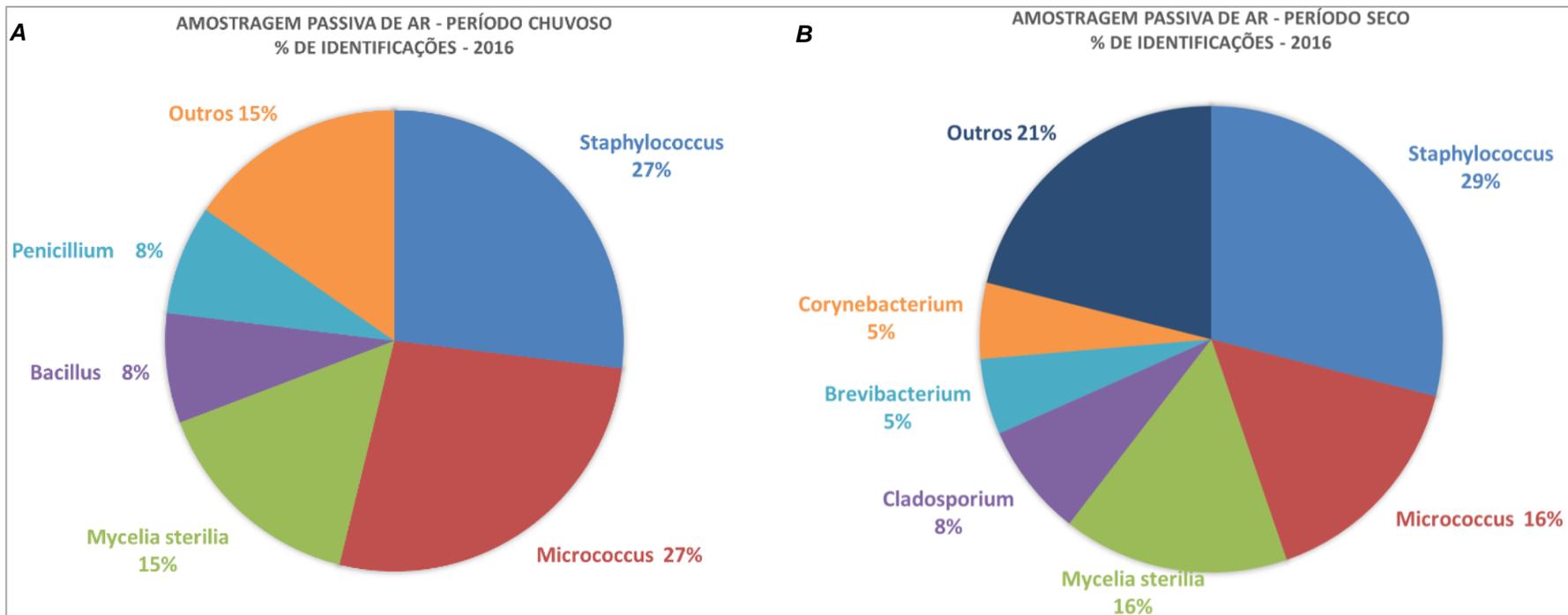


Figura 3-16. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar passivo durante o período chuvoso (A) e seco (B).

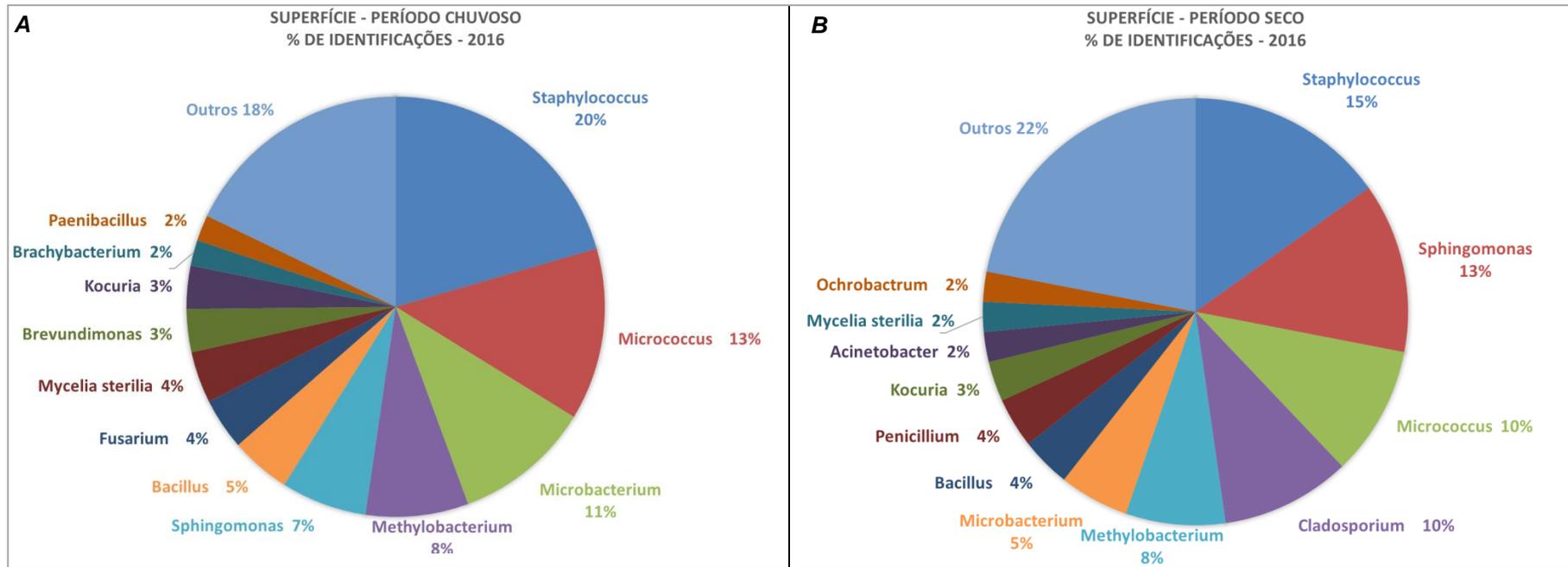


Figura 3-17. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de superfície durante o período chuvoso (A) e seco (B).

A grande ocorrência de *Mycelia sterilia* demonstra uma das principais limitações da metodologia de amostragem. Este nome é dado aos fungos cujo micélio não foi capaz de desenvolver os órgãos sexuais, que são usados como fator determinante para a classificação do bolor. A grande ocorrência deste tipo de configuração de micélio demonstra que o meio de cultura TSA, meio de cultura geral utilizado para a recuperação dos microrganismos, por não ser específico para fungos, não provê as condições necessárias para favorecer a diferenciação sexual de todos os fungos isolados, levando a identificações inconclusivas. Por terem sido classificados como tendo características macroscópicas diferentes (colônias representativas distintas), cada uma das colônias identificadas como *Mycelia sterilia* foi considerada uma ocorrência individual, mesmo que recuperada em mesmo ponto de amostragem.

Apesar de muitos fungos terem sido classificados como *Mycelia sterilia*, ou seja, sem a determinação de espécie, não há nenhum microrganismo da classe dos fungos cuja presença seja indesejável nos produtos manufaturados nestas áreas (produtos secos de uso oral).

Avaliando as especificações dos produtos manufaturados nestas áreas produtivas (produtos secos de uso oral), o único microrganismo indesejável é *Escherichia coli*, uma enterobactéria que, quando presente em medicamentos de uso oral, é capaz de levar os usuários a enfermidades. Dentre os microrganismos recuperados durante o período estudado, identificaram-se 4 ocorrências de enterobactérias, sendo apenas uma identificada como *Escherichia coli*. Esta colônia foi recuperada na amostragem de ar ativo do ponto "IC P02" no mês de julho, cuja ocorrência em ar ambiental não é muito comum, pois seu habitat característico é o trato gastrointestinal de vertebrados, principalmente o cólon, onde estabelece uma relação comensal com o hospedeiro (TENAILLON et al., 2010). Entretanto, uma variedade de cepas que apresentam fatores de virulência foram descritas na literatura (TENAILLON et al., 2010), podendo levar a enfermidades quando ingeridas por via oral. Por este mesmo motivo, a sua presença poderia indicar uma significativa falha na estratégia de controle de proteção ao produto. Portanto, para esta ocorrência em específico, no momento de sua detecção, foi realizada uma investigação para verificar se houve alguma interferência durante a amostragem e/ou incubação

ou se havia alguma causa na manufatura. Não foi possível atribuir uma causa para este resultado suspeito, porém, foram tomadas medidas como conscientização dos funcionários e alterações nos procedimentos, reforçando a necessidade de limpeza das mãos e materiais que entram na produção.

Como forma de avaliar de maneira mais abrangente, os microrganismos foram agrupados por características morfológicas, o que possibilitou evidenciar as possíveis fontes de contaminação mais frequentes. Os resultados são apresentados nas figuras 3-18 a 3-20.

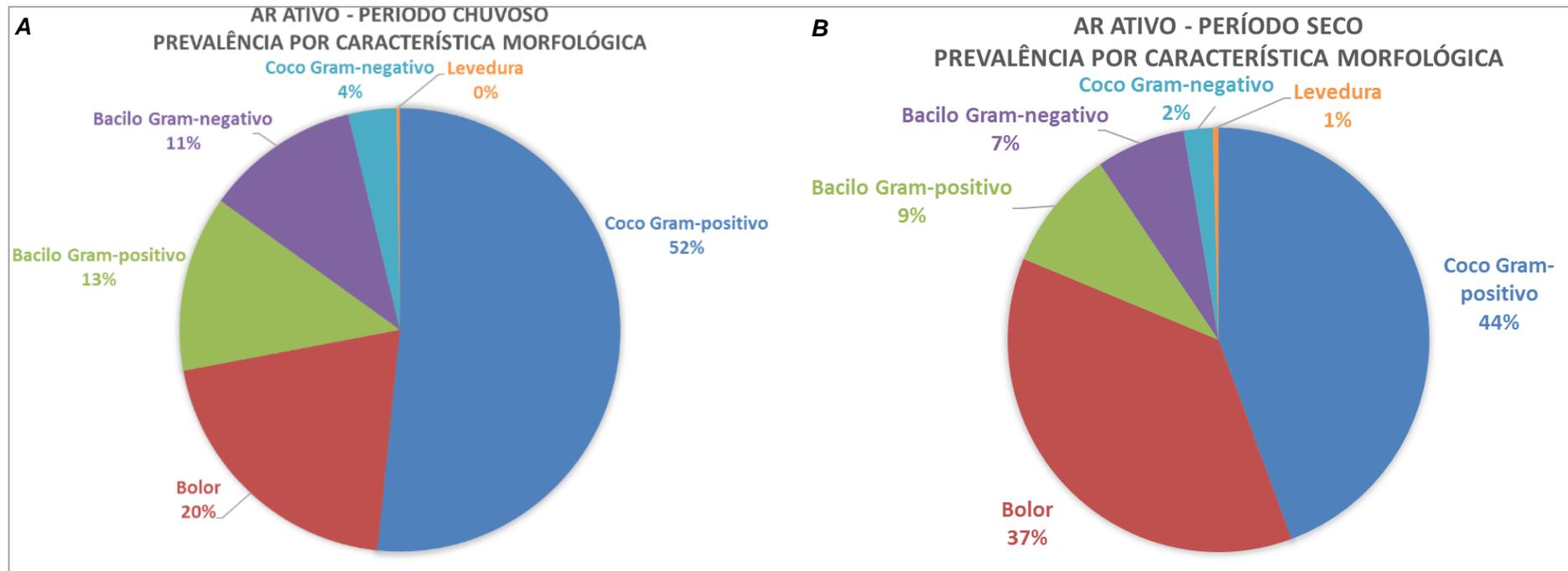


Figura 3-18. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar ativo durante o período chuvoso (A) e seco (B).

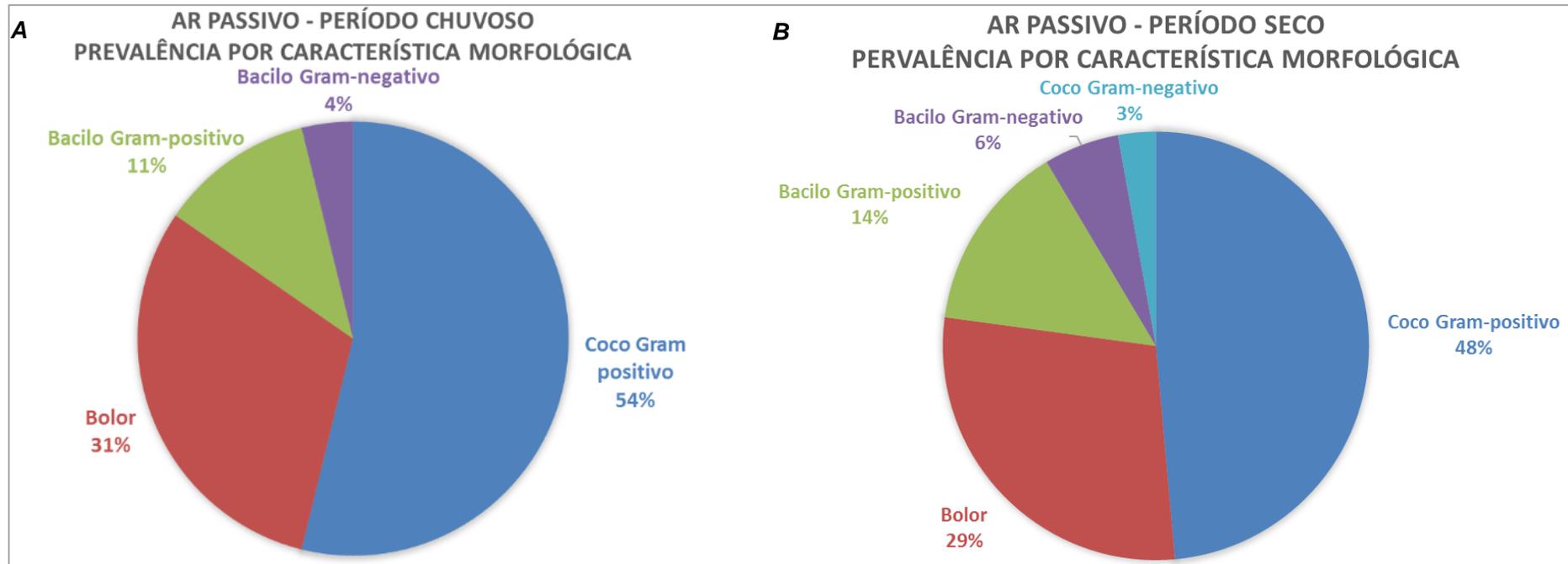


Figura 3-19: Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de ar passivo durante o período chuvoso (A) e seco (B).

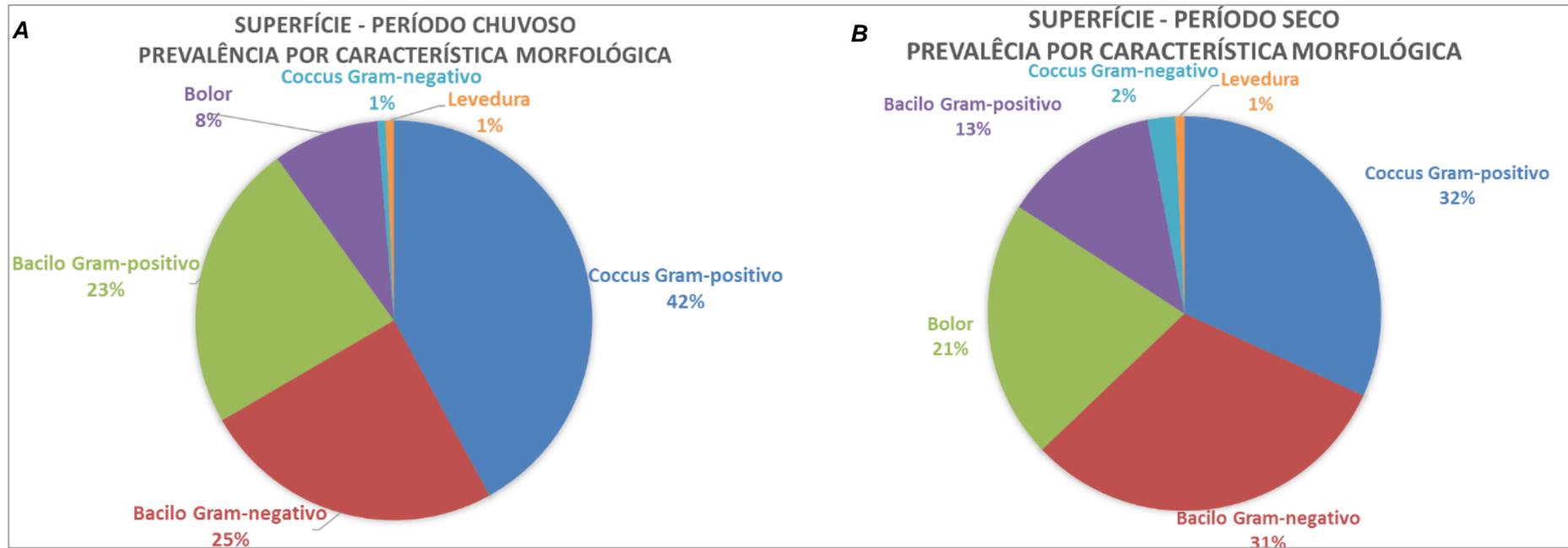


Figura 3-20. Classificação por gênero dos microrganismos recuperados em amostras de superfície durante o período chuvoso (A) e seco (B).

Por meio da avaliação dos gráficos e resultados obtidos, é possível observar que, em ambos os períodos e para os três tipos de amostragem, prevalece a ocorrência de cocos gram-positivos, comumente originários da microbiota da pele humana (ar ativo 52% e 44%; ar passivo 54% e 48% e superfície 42% e 32%). Este resultado é semelhante ao encontrado outrora por Sandle e Cundell, os quais identificaram que a principal fonte de contaminação do ambiente produtivo controlado é de origem humana (SANDLE, 2011; CUNDELL, 2006). Apesar do fato de que estes estudos abrangem áreas limpas mais críticas que o presente objeto de estudo, a extrapolação é possível por se tratar de ambientes cujos controles aplicados equivalem à Classe D dos Guias de Boas Práticas de fabricação.

Em seguida, para amostragens de ar observam-se fungos filamentosos ou bolores (ar ativo 20% e 37% e ar passivo 31% e 29%) e, em menor grau, de bacilos gram-positivos (ar ativo 13% e 9% e ar passivo 11% e 14%), ambos predominantemente originários do solo. Especificamente para amostragem de superfície, como segundo tipo de microrganismos mais prevalente, foi observada a ocorrência de bacilos gram-negativos (25% e 31%), comumente encontrados no solo e na água. Este fato pode ser um reflexo da utilização de água para a limpeza das superfícies em que ocorre a amostragem, sendo possível a recuperação deste tipo de microrganismo.

Outro estudo previamente realizado descreveu que os fungos recuperados em áreas de classe D representavam apenas a 8% do total (SANDLE, 2011), ou seja, uma ocorrência muito menor do que aquela observada no presente estudo. É possível observar uma prevalência maior de bolores no período seco do que no período chuvoso. Apesar do fato de que os bolores proliferam-se em ambientes mais úmidos, o período seco tende a apresentar maior quantidade de partículas em suspensão, o que propicia a circulação de esporos do ambiente externo à produção e a sua recuperação em amostras ambientais.

Este fato deve ser tratado com cautela devido às observações recentes da FDA e recalls associados a contaminação fúngica, incluindo contaminação de comprimidos, um dos produtos com menores condições para proliferação deste

microrganismo (CUNDELL, 2016). Assim sendo, medidas para minimizar a ocorrência de fungos no ambiente devem ser tomadas de forma a mitigar riscos de contaminação ao produto final uma vez que esporos podem resistir às condições de baixa atividade de água do produto.

4 ABORDAGEM ESTATÍSTICA PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL

Este capítulo deu origem ao artigo intitulado “Development of statistical approach for microbial monitoring on non-sterile pharmaceutical environments”, o qual foi submetido à revista Journal of Applied Statistics, (conceito Qualis 2018: B2).

4.1 CONTROLE EM PROCESSOS

Processos que apresentam nível de reprodutibilidade adequado podem ser, de certa maneira, previsíveis. Assim sendo, é comum que indústrias farmacêuticas adotem limites internos referentes à faixa de valores em que existe a maior probabilidade de ocorrência de um resultado em condições normais de processo, considerando a distribuição dos dados históricos e a sua dispersão ao redor de um valor médio ou mediana (PRINCE, 2008). É esperado que os limites internos sejam mais restritivos que os limites regulatórios, uma vez que nestas situações, assume-se que o processo conduzido apresenta menor variação de resultados do que tolerado em termos de segurança do paciente e pelas entidades regulatórias (PRINCE, 2008).

Os limites internos são comumente tratados como limites de alerta ou, para controle de parâmetros críticos, critério interno de aceitação (In-house Acceptance Criteria – IHAC), podendo estes se referirem aos limites superiores ou inferiores. Os limites de alerta são tratados como um valor indicativo de que o processo pode não estar operando de acordo com o esperado. Em casos de extrapolação de limites de alerta, pode ser necessário a tomada de ações para corrigir o problema, prevenindo a ocorrência de resultados fora das expectativas regulatórias e, conseqüentemente, de significativos impactos negativos. Já os limites determinados pelas agências regulatórias tratam-se de limites de ação, cujas ocorrências devem ser exaustivamente investigadas e, caso o resultado seja confirmado, impactos significativos no produto e no processo da companhia como um todo podem ocorrer. Nestes casos, é requerida aprofundada avaliação de impacto e as devidas ações corretivas e preventivas (CAPA – Corrective Actions and Preventative Actions) devem ser tomadas para retificar a não conformidade e evitar uma reincidência destes resultados (PRINCE, 2008).

O cálculo dos limites de alerta comumente está atrelado à curva de distribuição que melhor representa o conjunto de dados observados historicamente. Existem diversos tipos de distribuição, sendo o mais comum e, também, um dos tipos de maior importância estatística a distribuição normal. Apesar disso, outras fórmulas estatísticas foram desenhadas para prever a distribuição dos conjuntos de dados, como por exemplo a distribuição

exponencial, logarítmica, Weibull, Gamma-Poisson e Binomial. Como forma de comprovar que um dado conjunto de resultados distribui-se conforme uma das equações desenvolvidas, devem-se aplicar testes de hipóteses, cujo valor de significância demonstrará a aplicabilidade da função aos resultados obtidos (PRINCE, 2008).

O mesmo conceito tem sido vastamente aplicado para a avaliação de resultados de monitoramento ambiental, de forma a verificar se os controles desenvolvidos para a manutenção das condições assépticas ou de higiene das áreas produtivas estão operando de maneira eficaz. Dentro deste conceito, existe certo debate a literatura sobre as diferentes metodologias para avaliação destes resultados, considerando que existem limitações das técnicas de amostragem, que o crescimento microbiano é comumente avaliado por uma distribuição normal e que, principalmente para áreas assépticas, os resultados são extremamente baixos, o que limita a utilização de diversas ferramentas para o cálculo de limites (PRINCE, 2008). A maioria das avaliações leva em consideração o tipo de distribuição dos dados, aplicando, quando necessário, transformações dos resultados iniciais, a fim de que se aplique uma avaliação mais adequada.

4.2 MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA APLICADOS A MONITORAMENTO AMBIENTAL

4.2.1 Distribuição Normal

A distribuição normal é a mais comumente utilizada para controle em processos na produção de medicamentos. Por ser uma metodologia bastante consolidada, muitas empresas historicamente optaram por aplicar a utilização de gráficos de controle de Shewhart aos resultados de monitoramento ambiental, de forma a avaliar possíveis tendências, sendo aplicados limites de alerta e ação por meio das equações 4-1 e 4-2 cálculos abaixo, sendo \bar{X} a média amostral e S o desvio padrão do conjunto de dados avaliados (CAPUTO & HUFFMAN, 2004; WILSON, 1997).

Equação 4-1: Equação para determinação de limite de alerta em gráficos de controle de Shewhart.

$$\text{Limite de alerta} = \bar{X} \pm 2S$$

Equação 4-2: Equação para determinação de limite de ação em gráficos de controle de Shewhart.

$$\text{Limite da ação} = \bar{X} \pm 3S$$

Ambos os cálculos foram baseados na prática amplamente adotada para monitoramento de processos por meio de gráficos de controle, em que se assume que, para distribuição normal, 95,4% dos resultados estarão na faixa entre $\pm 2\sigma$ (desvios padrões) em relação à média populacional (μ) e que 99,7% deles estarão na faixa de variação de 3σ (desvios padrões), conforme exemplo na figura 4-1. Assim sendo, em um processo em controle, espera-se que 5% dos resultados esteja acima do limite de alerta e que 0,3% esteja acima do limite de ação, sendo razoável reagir durante uma excursão deste (PRINCE, 2008; MONTGOMERY, 2004).

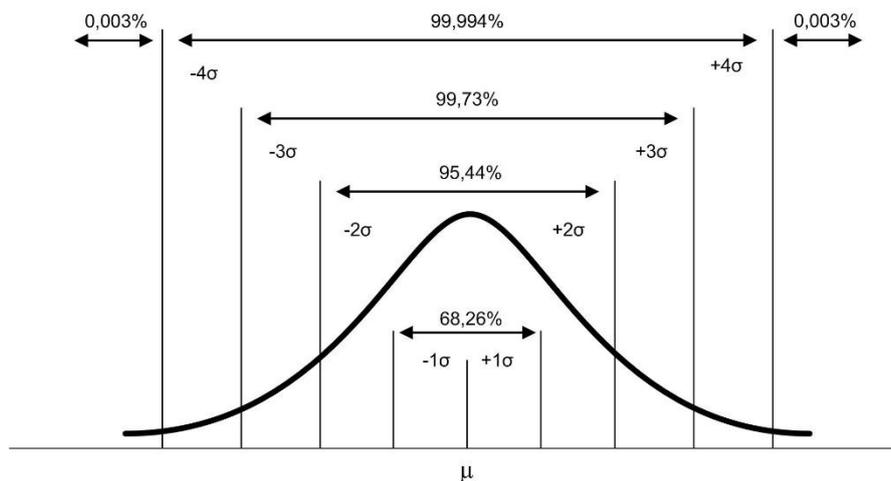


Figura 4-1. Exemplificação de um gráfico de distribuição normal e a porcentagem da população que se encontra dentro da faixa de variação de $1\sigma, 2\sigma, 3\sigma$ e 4σ ao redor da média μ , sendo σ o desvio padrão da população (Adaptado de: PORTAL ACTION, 2018).

Entretanto, é sabido que dados de monitoramento ambiental dificilmente seguem esse tipo de distribuição, haja vista que é alta a frequência de resultados próximos de zero, não seguindo o padrão simétrico da curva normal (CAPUTO & HUFFMAN, 2004). Assim sendo, caso a curva de distribuição adotada não represente adequadamente o conjunto de dados, os limites calculados, que abrangeriam 95,4% dos resultados, não representarão, na prática, esta probabilidade de ocorrência, havendo chances maiores de se obterem resultados acima dos limites que possam estar em controle e vice e versa.

Por outro lado, Bar demonstrou que, independentemente do tipo de distribuição dos dados, a aplicação de cartas gráficas de controle com media variável é possível, sem que seja necessária a transformação dos resultados a fim de se buscar a normalidade, pois, caso o ambiente produtivo esteja em controle, dificilmente os limites calculados para distribuição normal serão extrapolados (BAR, 2015).

4.2.2 Distribuição de Poisson e Gamma-Poisson (Binomial Negativa)

A distribuição de Poisson descreve a probabilidade de ocorrência de eventos raros em um dado intervalo de tempo e é uma aproximação da distribuição binomial. A equação matemática que descreve a distribuição de Poisson se dá conforme equação 4-3.

Equação 4-3. Descrição da distribuição de Poisson.

$$p(x, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \cdot \lambda^x}{x!} \text{ para } x = 0, 1, 2, \dots$$

Neste tipo de distribuição, o parâmetro da curva λ indica o número médio de eventos ocorridos em um dado intervalo e o desvio padrão pode ser representado como $\sqrt{\lambda}$. Na prática, os cálculos e o tratamento dos resultados

para este tipo de distribuição são bastante complicados e quando se tem um conjunto amostral pequeno, os dados devem ser tratados de maneira discreta ($x = 0, 1, 2, \dots$). É possível que um conjunto amostral característico da distribuição de Poisson aproxime-se da normalidade quanto maior for a sua média (λ), conforme esquematizado na figura 4-2. É requerido um $\lambda > 10$ para uma aproximação razoável e um $\lambda > 20$ para uma boa aproximação, conforme o teorema do limite central que afirma que “uma dada distribuição com média μ e variância σ^2 , aproxima-se da distribuição normal conforme o aumento do tamanho do grupo amostral”. Por isso, muitas empresas adotam a avaliação estatística com a utilização da distribuição normal, aumentando-se o número amostral, sendo requerida uma quantidade maior de resultados para interpretação adequada (SUN *et al.*, 2006).

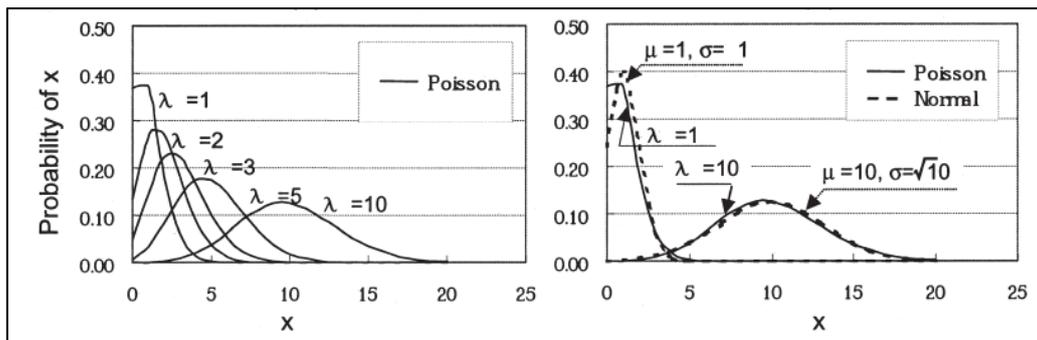


Figura 4-2. Distribuição de Poisson com o aumento da média (λ) de ocorrências (a) e comparação entre as distribuições normal e de Poisson para $\mu=1$ (normal), $\lambda=1$ (Poisson) e para $\mu=10$ (normal), $\lambda=10$ (Poisson) (Adaptado de: SUN *et al.*, 2006).

Alguns autores descrevem que a distribuição de Poisson normalmente se ajusta bem aos dados de monitoramento ambiental para áreas estéreis (PRINCE, 2008; SUN, 2006; WILSON, 1997). Em contrapartida, esse tipo de distribuição não leva em consideração a heterogeneidade das populações da amostra, uma vez que diferentes localizações e momentos da amostragem geralmente leva a diferentes processos randômicos, principalmente considerando que áreas não-estéreis tendem a ter uma variabilidade maior dos

resultados. Neste caso, o modelo de Poisson pode não ser adequado e tende a subestimar a variabilidade dos dados. Se aplicado na rotina, é possível que ocorra uma quantidade grande de alarmes falsos para excursões microbianas, assim como quando se supõe uma distribuição normal (YANG et al., 2013).

Yang et al. sugere corrigir a maior dispersão dos dados usando a distribuição Binomial Negativa ou Gamma-Poisson, uma vez que se tratam de uma generalização da curva de Poisson, permitindo que a média varie de acordo com a distribuição gamma (YANG et al., 2013).

4.2.3 Modelos zero-inflacionados

O ambiente produtivo asséptico, principalmente áreas de classe A e B, ISO classe 5 ou classe 100, para o FDA, apresentam contagens ambientais extremamente baixas, com resultados, em sua maioria, zero UFC. Sendo um conjunto de dados bastante limitado, pode levar a estimativas equivocadas durante a determinação de limites de alerta e ação.

Sun et al. apresentaram as bases teóricas e matemáticas da aplicação do número mais provável (MPN) a conjunto de resultados deste tipo, desde que sigam a distribuição de Poisson. O MPN é uma técnica bem consolidada para a estimativa da densidade de microrganismos a partir de diluições seriadas. A técnica considera que uma dada amostra com certa carga microbiana, relativamente elevada, apresenta microrganismos distribuídos randomicamente e de forma contínua, pela distribuição normal. Ao se realizarem diluições seriadas, a concentração de microrganismos na amostra torna-se tão baixa, que passa a seguir a distribuição de Poisson. Assim sendo, a avaliação do MPN se dá em uma densidade de microrganismos baixa o suficiente para que seja possível obter resultados positivos e negativos simultaneamente (SUN et al., 2006). Vide esquema ilustrativo do processo de diluições seriadas para avaliação do NMP na figura 4-3.

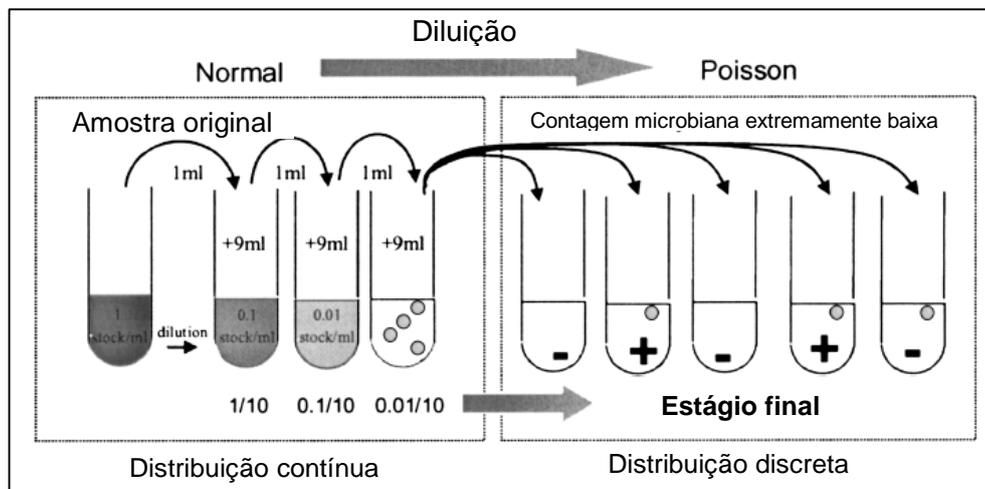


Figura 4-3. Esquema ilustrativo da distribuição de partículas em ao longo das diluições seriadas conforme técnica NMP (Adaptado de: SUN et al., 2006).

Halvorson e Ziegler (1932) foram os primeiros autores a apresentar as bases matemáticas do NMP, cujos fundamentos estatísticos são baseados na distribuição de Poisson. A equação 4-4, descrita por Halvorson e Ziegler, estima a máxima probabilidade quando a razão entre amostras estéreis e o total de amostras (s/n) foi avaliada com base na distribuição binomial (HALVORSON & ZIEGLER, 1932).

Equação 4-4. Equação de Halvorson e Ziegler, onde d é o MPN, s é o valor de amostras que não apresentam crescimento e n o número total de amostras.

$$d = -\ln(s/n)$$

Comparativamente, os dados de monitoramento ambiental obtidos de áreas assépticas apresentam, da forma como se encontram, o mesmo comportamento e as mesmas propriedades das amostras diluídas pelo método MPN (SUN et al., 2006).

Sun et al. avaliaram que os valores MPN, obtidos com a aplicação da equação de Halvorson e Ziegler (equação 4-4), são, em geral, mais altos do que a média aritmética, demonstrando uma sensibilidade maior com a utilização dessa técnica, ou seja, uma estimativa mais precisa. A aplicação desta técnica nada mais é do que um simples tratamento de dados de amostra que seguem a distribuição de Poisson (SUN et al., 2006).

4.2.4 Distribuição exponencial negativo

Embora dos dados de monitoramento ambiental não sejam contínuos, a aproximação a este tipo de distribuição é razoável para dados de monitoramento ambiental (WILSON, 1997), uma vez que para áreas controladas, espera-se uma menor ocorrência de resultados.

4.2.5 Distribuição de Weibull

A distribuição de Weibull é aplicável para variáveis contínuas, comumente baseada na avaliação da ocorrência de falha em função do tempo e a determinação do tempo de vida média de produtos, ou seja, é possível determinar a quantidade de peças que falharão em um dado período de tempo e o tempo que pode durar uma peça. Por se tratar da ocorrência de eventos, seus valores podem variar de 0 a $+\infty$ (MONTGOMERY, 2004).

Esta função é capaz de assumir uma grande variedade de formas a depender de um fator que se aplica a esse tipo de distribuição (fator K). Apesar disso, a função da taxa de falha é monótona, podendo ser estritamente crescente, estritamente decrescente ou constante. Quando $k=1$, a curva assemelha-se à função exponencial. Por isso, muitas vezes, a distribuição de Weibull é considerada uma generalização da distribuição exponencial (MONTGOMERY, 2004).

Tem a característica de apresentar exatidão mesmo com quantidade de dados limitada, pois, ao se fazer uso do modelo de regressão por teste acelerado, é possível prever os parâmetros mesmo com um pequeno número de dados (MONTGOMERY, 2004).

Extrapolando estes conceitos para o cenário de dados de monitoramento ambiental, a “falha” normalmente é tratada como a presença de crescimento microbiano, independentemente das contagens absolutas de cada placa. Assim sendo, áreas controladas classes A e B, cuja ocorrência de crescimento é rara, podem ser um amplo campo para aplicação deste tipo de distribuição.

Já para áreas classes C, D e áreas produtivas não-estéreis, onde o crescimento microbiano é mais frequente, a “falha” assume outro significado. Haja vista que boa parte das amostras apresentará crescimento microbiano, uma boa aplicação deste modelo é a previsão da ocorrência de resultados acima dos limites de alerta previamente determinados.

4.2.6 Cartas gráficas com média móvel

Mesmo tendo sido desenvolvida uma vasta gama de abordagens estatísticas para monitoramento ambiental, Bar demonstrou que, independentemente do tipo de distribuição dos dados, a aplicação de cartas gráficas de controle com média variável é possível, sem que seja necessária a transformação dos resultados a fim de se buscar a normalidade, pois, caso o ambiente produtivo esteja em controle, dificilmente os limites calculados para distribuição normal serão extrapolados (BAR, 2015).

Diante dos fatos apresentados, principalmente em virtude das características do produto final, observa-se que pouco destaque tem se dado ao monitoramento ambiental envolvendo a manufatura de produtos não-estéreis. Não existe uma padronização dos aspectos relacionados à avaliação de tendências; os limites de alerta e ação, em muitos casos, não são determinados, e, além disso, as caracterizações da microbiota ambiental são superficiais.

4.3 OBJETIVO

Esse estudo teve como objetivo a caracterização dos ambientes farmacêuticos não-estéreis de duas indústrias diferentes, porém com processos

semelhantes, pela perspectiva estatística em termos de recuperação microbiana. Adicionalmente, espera-se contribuir com a literatura científica pelo desenvolvimento de uma abordagem estatística para monitoramento microbiológico ambiental para ser aplicado a este tipo de ambiente.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Ambiente de estudo

Foram avaliados os dados de monitoramento ambiental provenientes de duas indústrias farmacêuticas localizadas na região tropical em diferentes hemisférios, sendo Indústria A pertencente ao hemisfério sul e Indústria B, no hemisfério norte.

As amostras foram tomadas de salas de processo, onde ocorrem as operações unitárias e pode, potencialmente, ocorrer a exposição do produto, e salas de não-processo, que funcionam como suporte para as salas de processo, como áreas de lavagem, gownings (antessalas) e salas para armazenar equipamentos limpos. Todas as salas integram o Programa de Monitoramento Ambiental previamente avaliado conforme criticidade de cada uma.

Devido a particularidades das instalações, o tamanho de amostra (N) foi diferente para cada uma das indústrias.

4.4.2 Coleta de dados

Para a avaliação preliminar dos dados e desenvolvimento da abordagem estatística, foram utilizados dados coletados de diferentes períodos que, ao todo, compreenderam setembro de 2013 e dezembro de 2017, sendo descritos em detalhes nas seções 4.5 e 4.6. Foram incluídos os três tipos de amostragem comumente aplicados para monitoramento ambiental para áreas não-estéreis, como descrito nos itens 3.4.5 a 3.4.9. Salas de processo são amostradas por todos os três tipos de amostragem, enquanto que para salas que não são de processamento, apenas a amostragem de ar ativa é aplicada, uma vez que nenhuma exposição do produto ocorre nessas áreas. Embora ambos ambientes

de produção sejam categorizados como não-estéreis, as indústrias aplicam controles de partículas viáveis e não-viáveis nas áreas produtivas, seguindo os requerimentos especificados para áreas classe D, de acordo com os guias BPF e classe ISO 8, descrita na ISO-14644.

4.4.3 Ferramenta estatística

Foi utilizado software estatístico validado John's Macintosh Program (JMP®) versão 12 para a construção dos gráficos de controle e realização dos testes de hipóteses para avaliação da distribuição dos dados, bem como a análise de variância e cálculo da capacidade do processo.

4.5 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DOS DADOS

Como parte da construção do conhecimento e caracterização microbiana das áreas produtivas não-estéreis, foi realizada uma avaliação estatística preliminar dos dados utilizando apenas uma Indústria A e por um período de coleta de dados de setembro de 2013 a junho de 2017, obtidos somente pela amostragem ativa por apresentar a maior quantidade de resultados, de forma a obter um número amostral elevado.

As contagens microbianas obtidas durante o período foram avaliadas por meio do software JMP frente à aplicação de *fit tests* (teste de hipóteses) para a avaliação da distribuição estatística, os quais são apresentados a seguir. Os dados foram testados frente às distribuições Normal, Poisson, Gamma-Poisson, Binomial e Beta-binomial, além das distribuições exponencial e de Weibull, com base nos tipos de distribuição já citados na literatura. Entretanto, nenhum dos resultados apresentaram valor de significância (*p-value*) maior que 0,05, rejeitando-se a hipótese H_0 que afirma que a distribuição dos dados pode ser descrita pela equação de probabilidade testada.

A figura 4-4 representa o histograma traçado com os resultados de ar ativo para monitoramento ambiental e estão traçadas as curvas referentes aos diferentes tipos de distribuição testados. Avaliando visualmente o histograma, é possível perceber que nenhuma das curvas descreve exatamente da distribuição

real dos dados do histograma e que existe grande ocorrência de resultados discrepantes do conjunto de dados (*outliers*) o que evidencia os resultados sem sucesso dos *fit tests* aplicados.

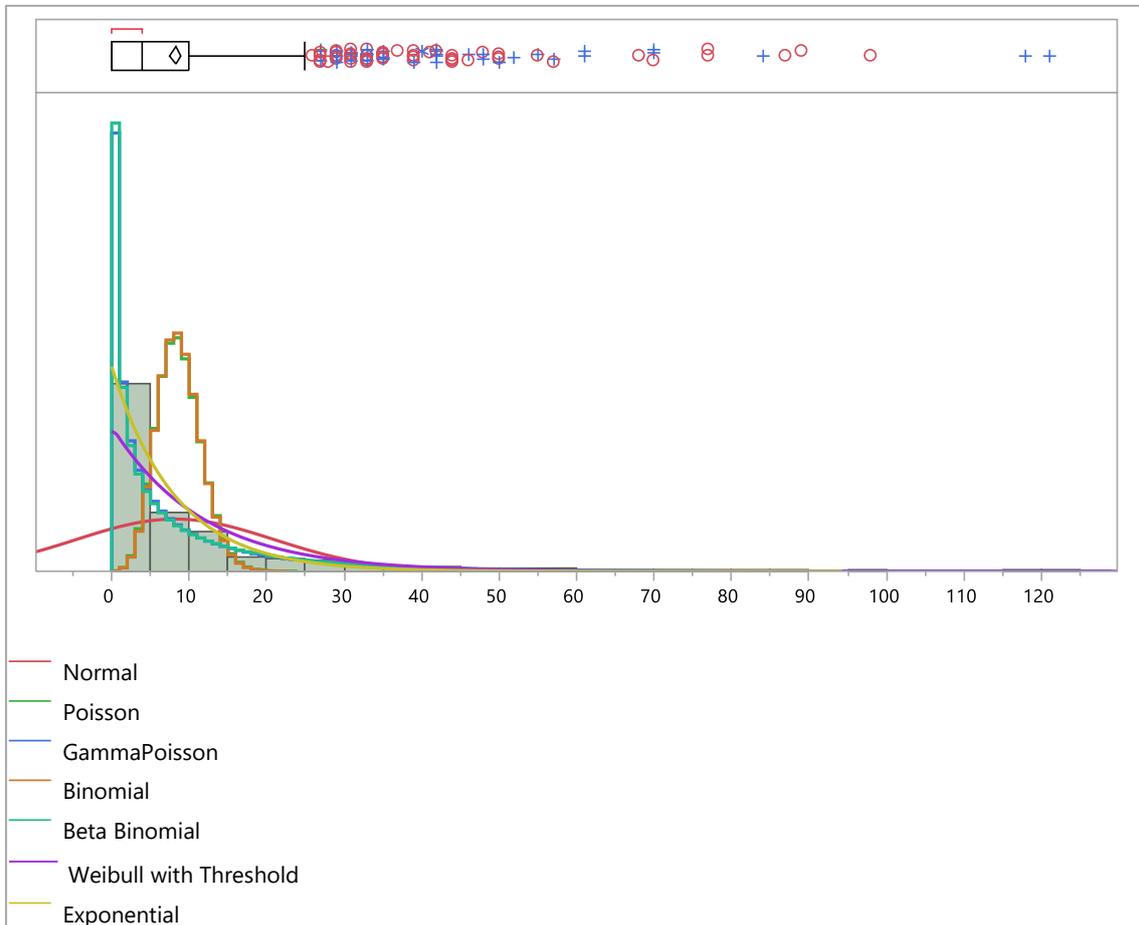


Figura 4-4. Histograma dos resultados de amostragem de ar ativo para monitoramento ambiental frente às curvas de probabilidade traçadas para os diferentes tipos de distribuição testados. Contagens em ar ativo UFC/m³.

Conforme evidências na literatura, esperava-se que os resultados pudessem ter boa aproximação com a distribuição de Gamma-Poisson (UNITED, 2018c; BAR, 2015; YANG et al., 2013; SUN et al., 2006; WILSON, 1997), especialmente as áreas com baixas contagens de microrganismos, como as cabines de pesagem, devido ao comportamento semelhante às áreas controladas. Assim sendo, foi realizada nova avaliação individual por sala, apesar da drástica redução do número amostral, como maneira de verificar se os distintos comportamentos poderiam impactar na resposta dos testes de

probabilidade (fit-test) obtidos com o conjunto de dados. Os resultados estão descritos na tabela 4-1.

De acordo com os resultados obtidos por sala, é possível perceber que a maioria dos resultados de fit-test rejeitou a hipótese H_0 , não sendo possível encontrar a curva de distribuição que melhor descreva o conjunto de dados. Alguns resultados positivos obtidos supostamente significariam que os dados específicos de algumas salas seriam descritos pelas referidas distribuições. Entretanto, muitas vezes, a avaliação visual não demonstrou a mesma semelhança, como o exemplo da sala AL, para a qual se obtiveram bons resultados de *fit test* para Gamma-Poisson, mas visualmente, não se vê relação entre a curva e a distribuição dos dados (figura 4-5).

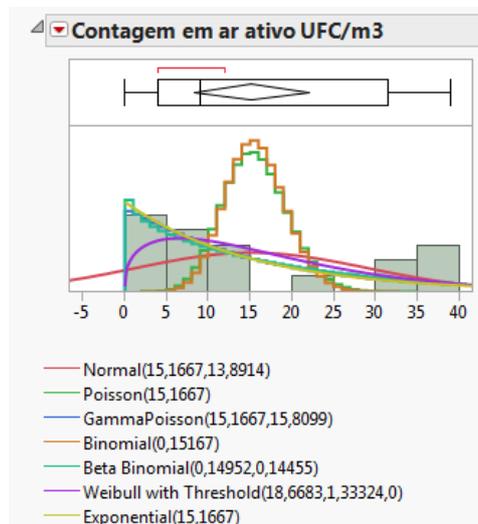


Figura 4-5. Curvas de distribuição traçadas com relação aos dados de monitoramento da sala AL. Note que, apesar de apresentar resultado significativo para o teste de hipótese do tipo de distribuição de Gamma-Poisson, não se observa sobreposição exata da curva ao conjunto de dados.

Devido aos resultados obtidos, os dados classificados como *outliers* durante avaliação de dispersão, ou seja, estatisticamente discrepantes do conjunto de dados analisado, foram excluídos dos cálculos apenas como forma investigativa, uma vez que não podem ser excluídos dados da avaliação apenas

por se tratarem de *outliers*, sem que seja atribuída uma causa ou que haja um racional que justifique a sua remoção (PRINCE, 2008).

Assim sendo, foram realizados novamente os de *fit tests* tanto para os dados gerais, quanto individualmente por sala, os quais são apresentados abaixo (tabela 4-1). Entretanto, poucos resultados alteraram-se, demonstrando que os dados considerados estatisticamente outliers não eram fator determinante para a falha nos resultados de fit-test.

Tabela 4-1. Resultados obtidos com a realização dos testes de hipóteses dos dados gerais e por sala frente aos diferentes tipos de distribuição com a utilização dos dados completos (O*) e após exclusão de outliers (E*).

Sala	Goodness of fit														
	Normal Shapiro walk W test (Prob<W)		Poisson Pearson ChiSquared (Prob>X2)		Gamma- Poisson Pearson ChiSquared (Prob>X2)		Binomial Pearson ChiSquared (Prob>X2)		Beta-binomial Pearson ChiSquared (Prob>X2)		Weibull Cramer-von Mises W test (Prob>W ²)		Exponencial Kolmogorov's D (Prob>D)		
	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	(O*)	(E*)	
Geral	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
CP1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0044	0,0044	<0,0001	<0,0001	0,0046	0,0046	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
CP2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
CP3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
C1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
ML	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	0,0844
AL	0,0042	0,4319	<0,0001	0,3272	0,7735	0,5419	<0,0001	0,3180	0,7923	0,5433	<0,0100	<0,0100	0,1500	0,0381	
MC	<0,0001	0,0007	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	0,0941	<0,0100	
C2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
E	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
R1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
IC	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
R2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
EMB	<0,0001	0,0086	<0,0001	<0,0001	0,9647	0,8958	<0,0001	<0,0001	1,0000	0,9978	<0,0100	<0,0100	0,0746	0,0876	
G1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
G2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
G3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0100	<0,0100	0,1500	0,1016	

Nota: Hipótese alternativa H₀: "Os dados se distribuem conforme modelo testado". Valores de probabilidade < 0,05 rejeitam H₀.

Conforme sugerido por Wilson, é importante que a avaliação estatística seja seguida de uma avaliação visual dos histogramas obtidos (WILSON,1997). Avaliando as figuras 4-6 a 4-11, que contemplam os histogramas obtidos frente as curvas de distribuição com e sem os *outliers* por sala, pode-se perceber que mesmo não apresentando bons resultados nos testes de hipótese a equação que melhor descreveria os dados de monitoramento ambiental é a aproximação de Gamma-Poisson. Visualmente, os conjuntos com a exclusão dos *outliers* aparentam ter melhores aproximações para as curvas, principalmente para Poisson e Gamma-Poisson.

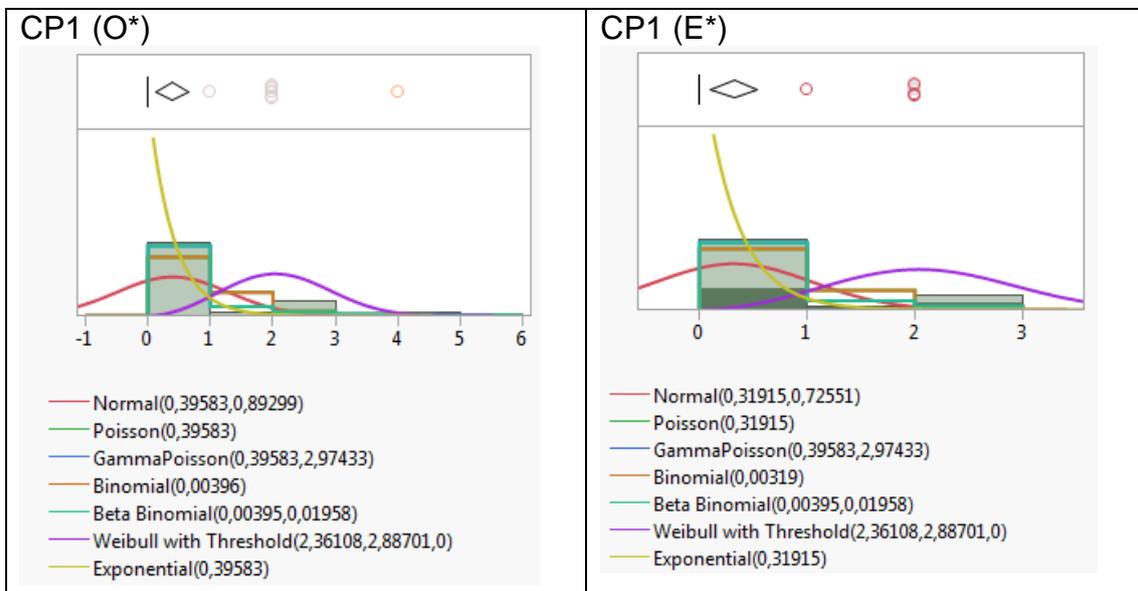


Figura 4-6. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos *outliers* (E*) dos dados de monitoramento ambiental da sala CP1.

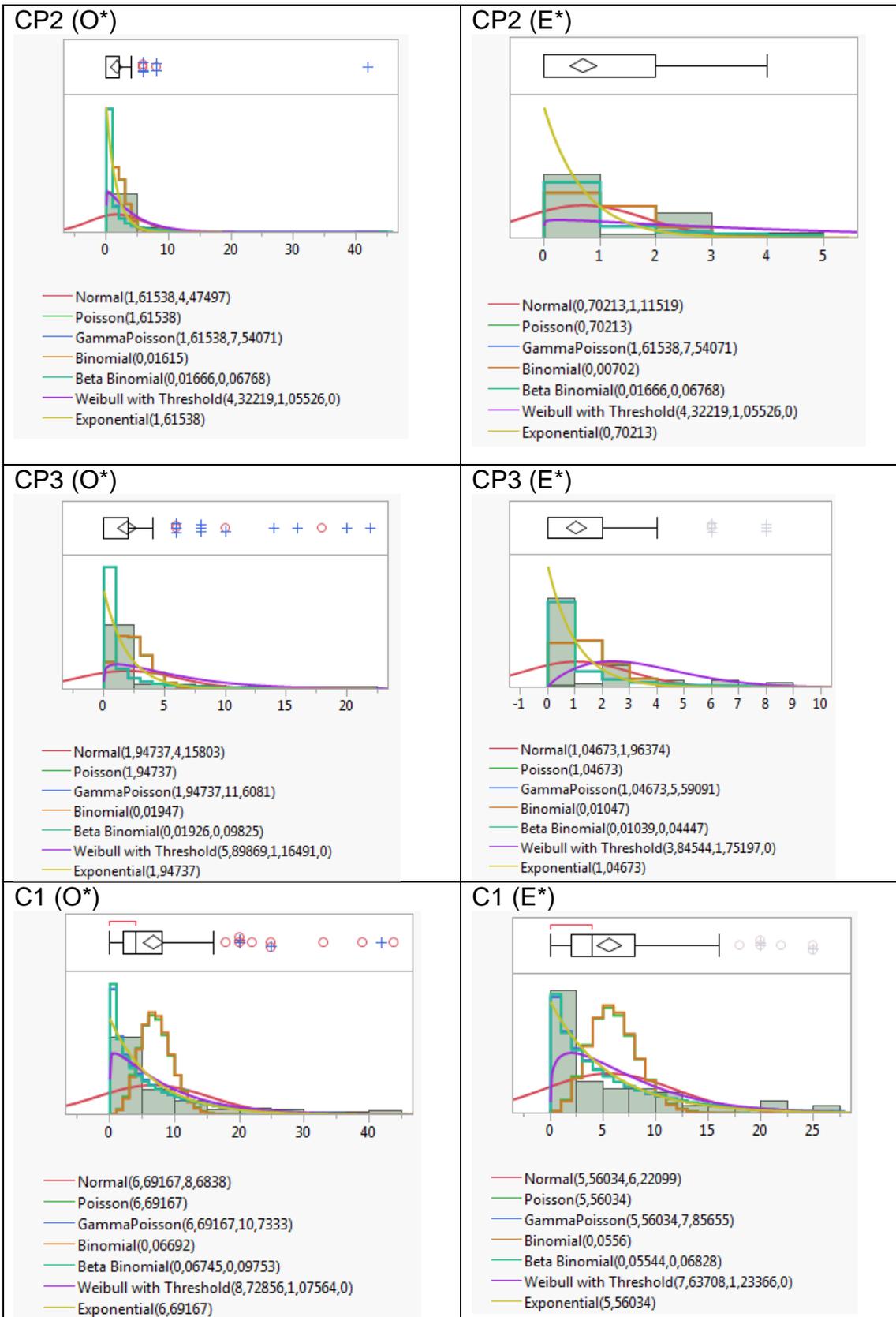


Figura 4-7. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas CP2, CP3 e C1.

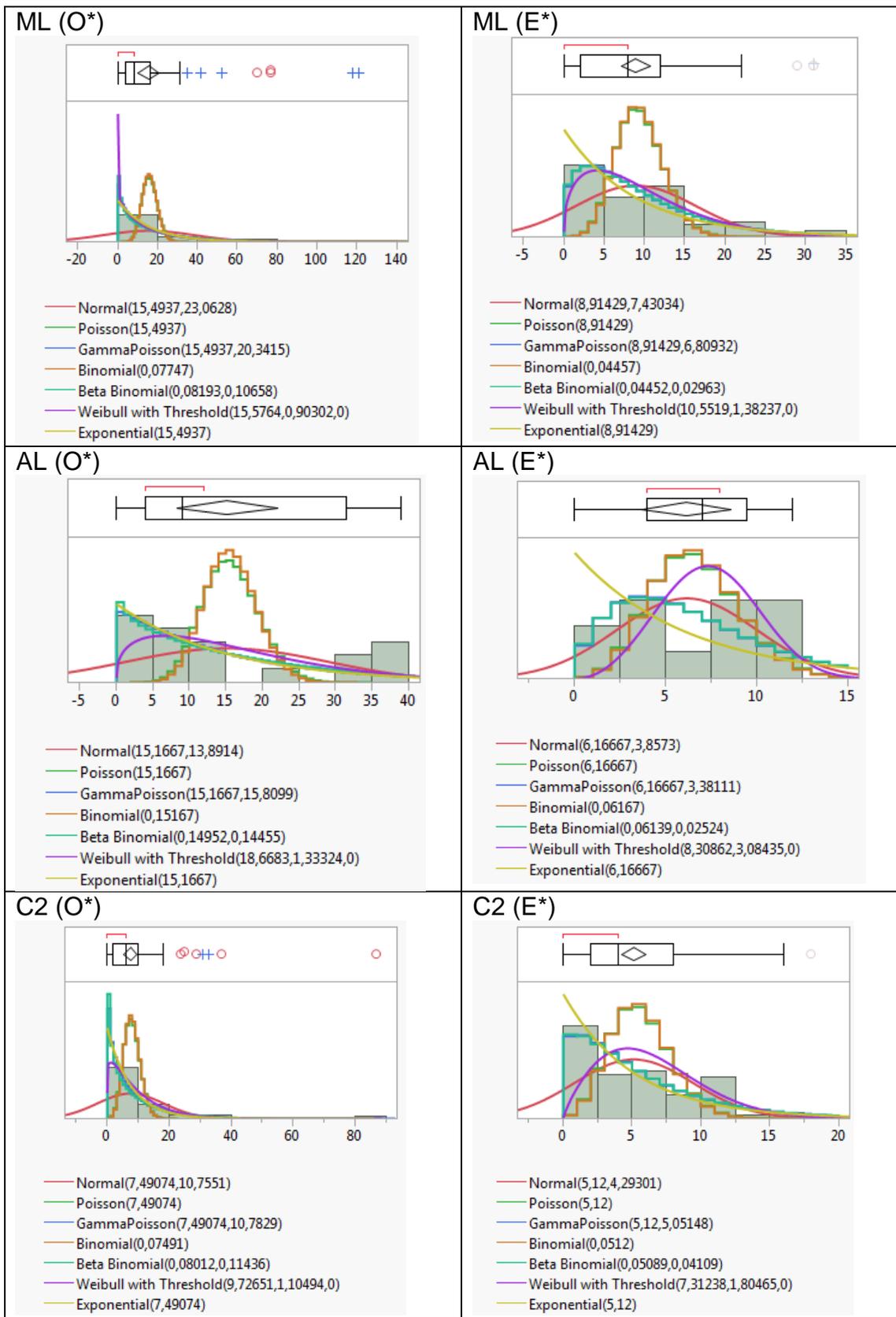


Figura 4-8. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas ML, AL e C2.

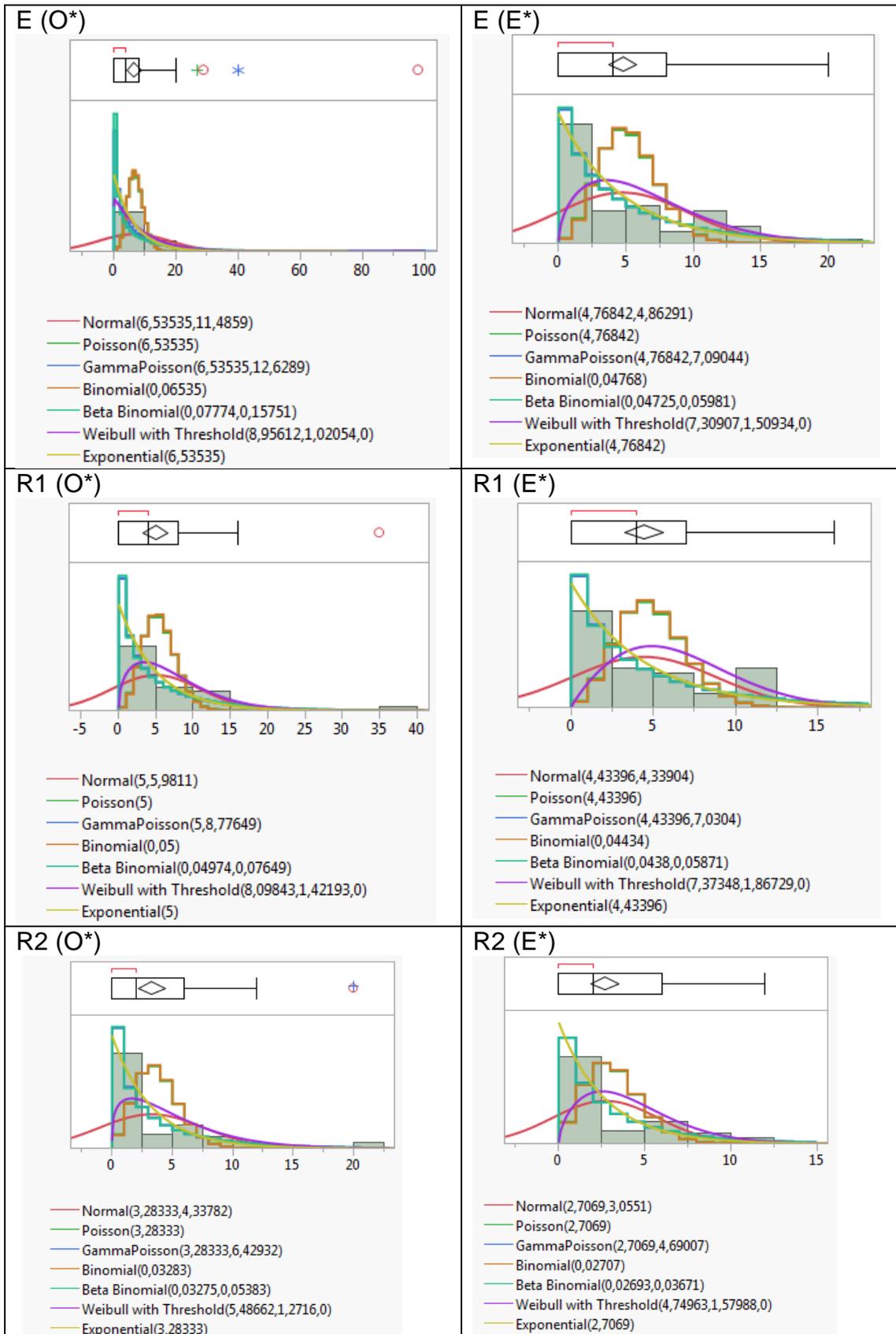


Figura 4-9. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas E, R1 e R2.

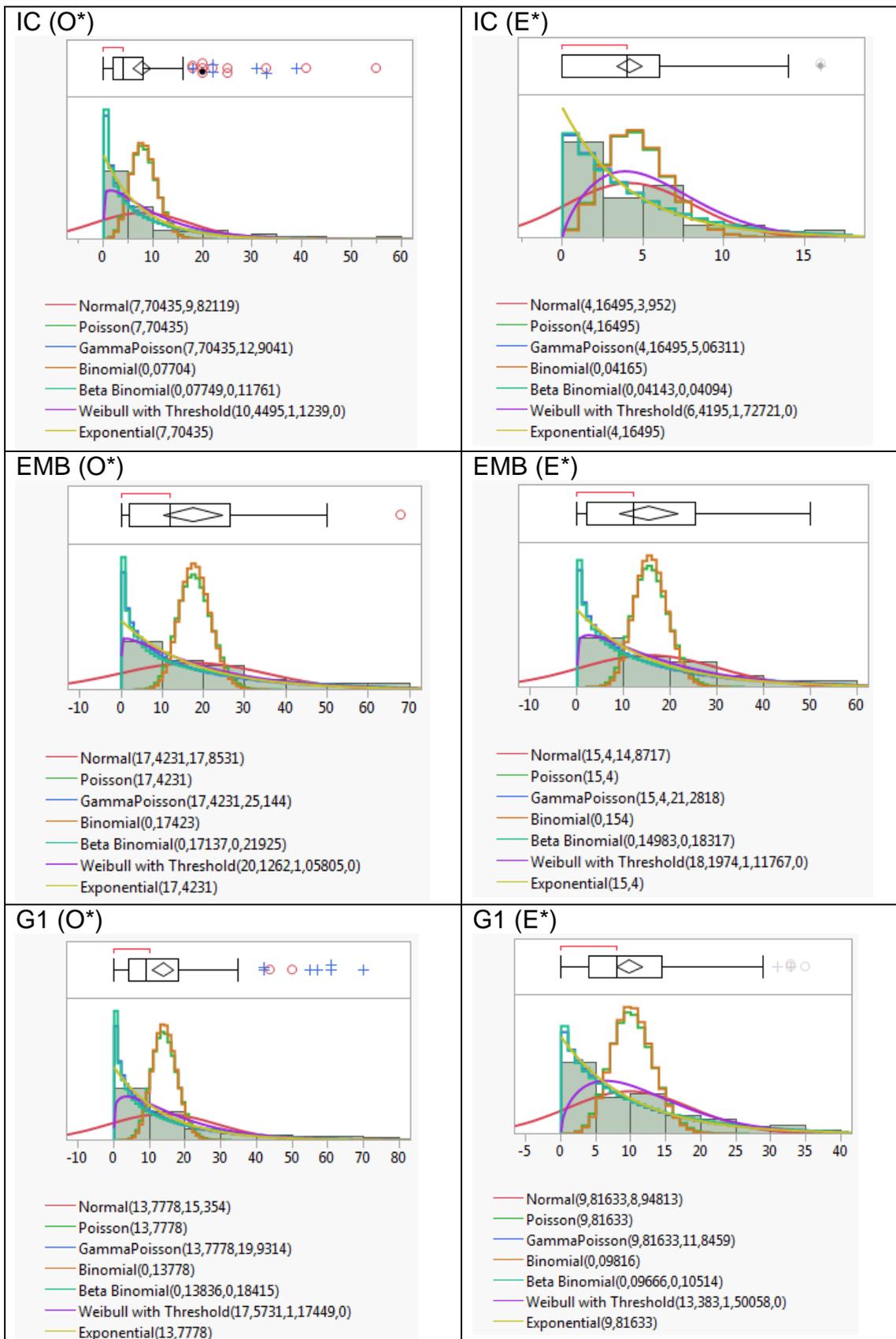


Figura 4-10. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas IC, EMB e G1.

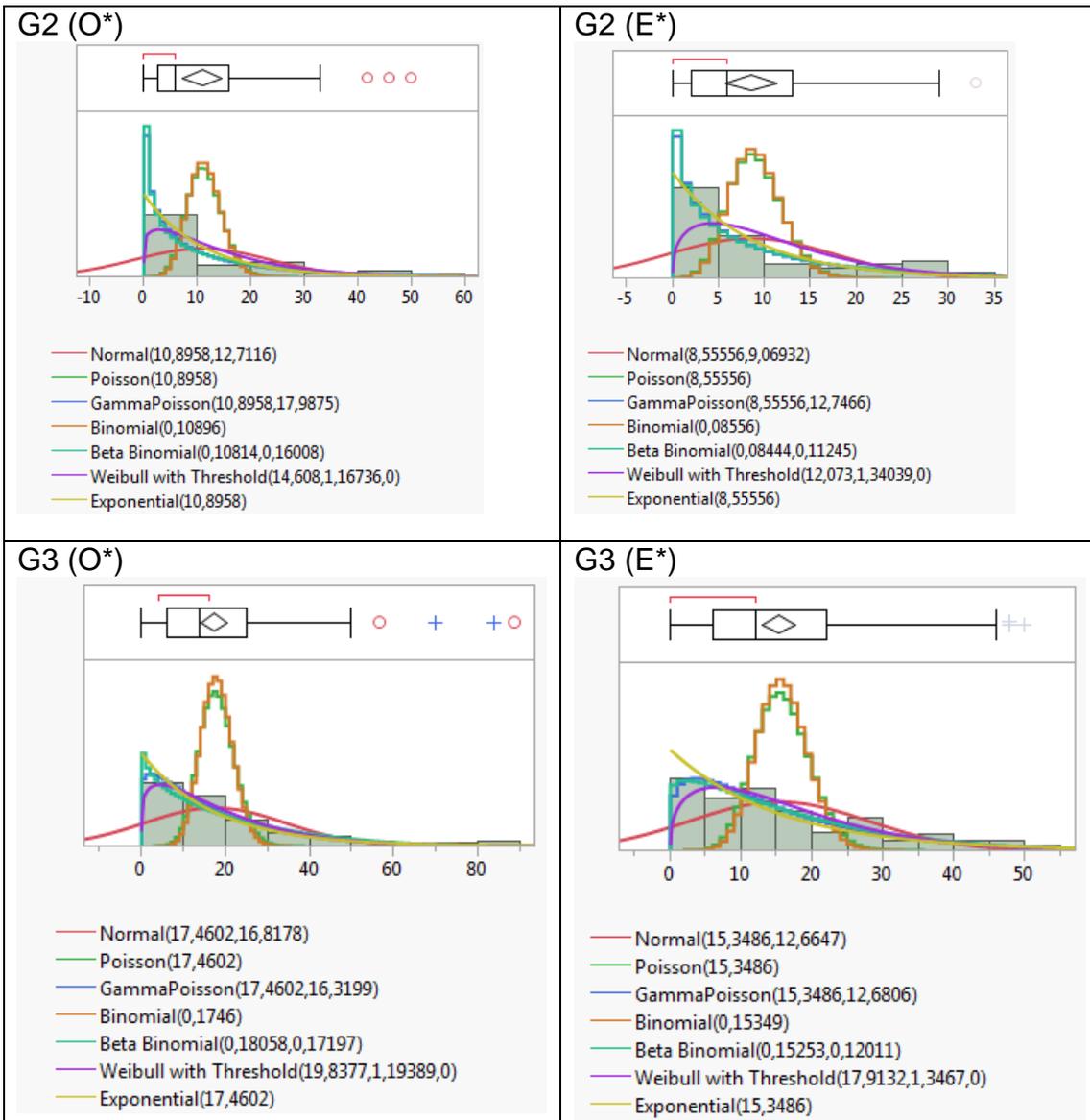


Figura 4-11. Histogramas e curvas de distribuição obtidos com a avaliação inicial (O*) e após a exclusão dos outliers (E*) dos dados de monitoramento ambiental das salas G2 e G3.

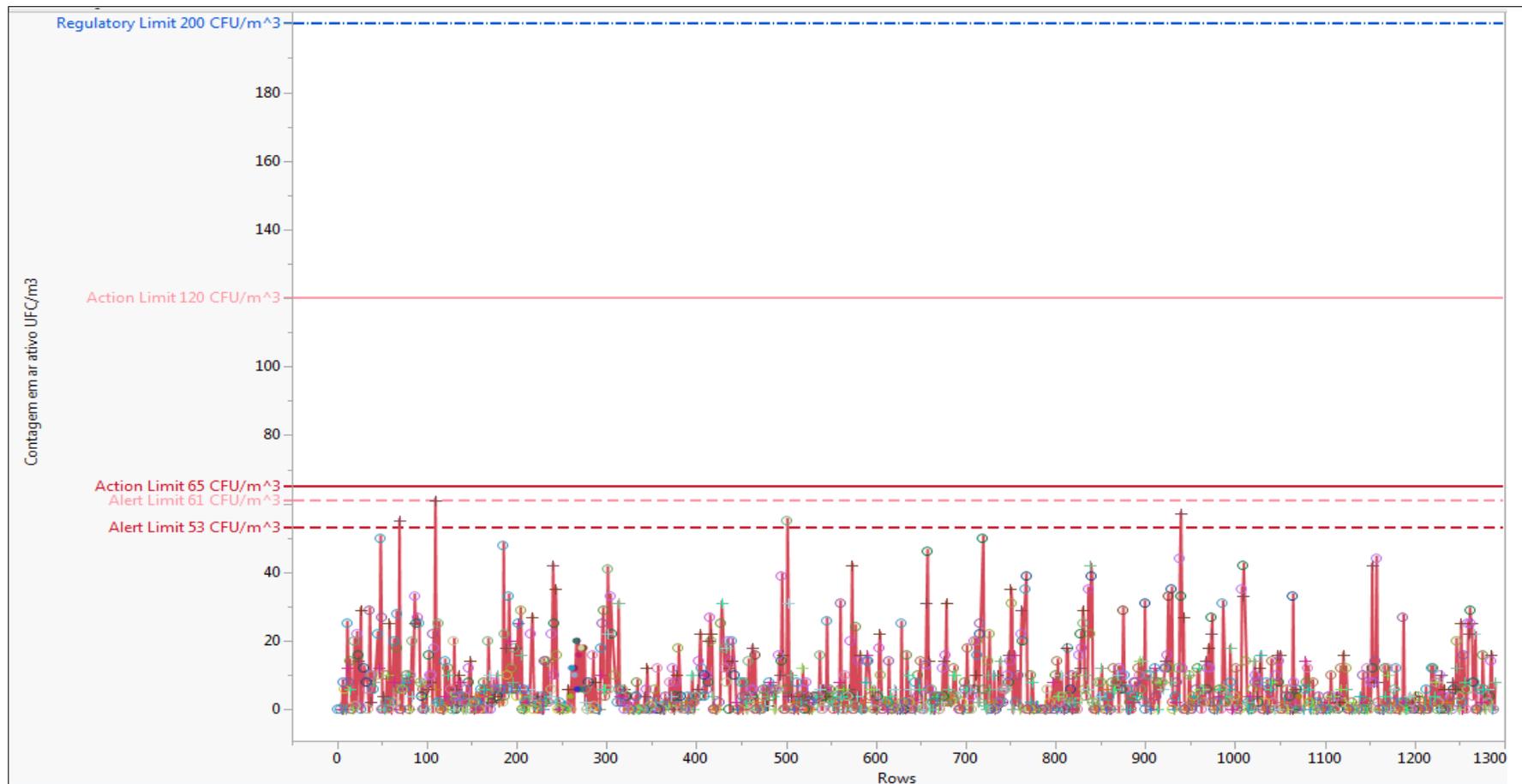
Em virtude dos resultados obtidos, uma das abordagens alternativas seria a aplicação de uma curva de distribuição baseada nos dados obtidos, como a *Smooth curve* (Curva atenuada) de forma que, considerando todos os resultados obtidos como provenientes de condições normais de processo, podem-se obter limites de alerta e ação que representem a realidade do ambiente produtivo em estudo.

Assim sendo, foi realizada a aproximação com *Smooth Curve* para todos os dados das amostragens de ar ativo e os limites obtidos com esta metodologia foram comparados com aqueles obtidos com a aplicação da distribuição de Gamma-Poisson.

Os limites foram determinados de acordo com os quantis de forma que 99,73% dos resultados obtidos estivessem dentro do limite de alerta e 99,994% do limite de ação, cujas probabilidades são usualmente aplicadas em monitoramento de processos.

Considerando a distribuição de Gamma-Poisson, os limites obtidos foram de 61 UFC/m³ para alerta e 121 UFC/m³ para ação. Por outro lado, aplicando o *Smooth Curve*, foram obtidos os limites de 53 UFC/m³ para alerta e 65 UFC/m³. É possível perceber que os limites obtidos pela aproximação por *Smooth Curve* apresentaram-se mais restritos do que a determinação dos quantis por Gamma-Poisson, sendo observados alguns resultados acima do limite de alerta para o primeiro caso, mas não para o segundo, por serem limites mais amplos (gráfico 4-1). Entretanto, em ambos os casos, observa-se um distanciamento grande em relação ao limite esperado para áreas classificadas como grau D (200 UFC/m³), conforme expectativas para esta área.

Gráfico 4-1. Dispersão do conjunto de resultados obtidos com a amostragem de ar ativo durante o período estudado. Foram incluídos os limites calculados pela determinação de quantis com base na distribuição de Gamma-Poisson (linhas contínua e tracejada vermelho-claro) e com base no *Smooth Curve* traçado para o conjunto de dados (linhas contínua e tracejada vermelho escuro). Está representado em azul o limite considerado para áreas de classe D, conforme guias BPF de 200 UFC/m³ (EUROPEAN, 2014b).



Por todos os aspectos mencionados, é possível perceber que, após avaliação dos dados de amostragem ativa de monitoramento ambiental do período citado, não foi possível obter resultados consistentes que pudessem demonstrar matematicamente a melhor curva de probabilidade que descreve o conjunto amostral, seja avaliando os dados brutos na íntegra, com a exclusão de dados considerados *outliers* estatisticamente ou com a avaliação separadamente por sala. Este fato pode estar relacionado ao extenso período de avaliação, uma vez que, de forma a obter um alto número amostral, foram avaliados 46 meses, ao invés de 24, como prática adotada para controle de processos (MONTGOMERY, 2004). A avaliação visual das curvas de distribuição frente ao histograma evidenciou que a curva que mais se aproxima do conjunto de dados foi a distribuição de Gamma-Poisson, apesar de não fornecer uma boa resposta quanto ao teste de probabilidade (fit-test). Uma vez não obtendo resultados robustos nesta fase de avaliação, os dados foram profundamente avaliados, sendo excluídos aqueles que, com causa atribuível, representam as condições normais de operação das áreas e, em seguida foi traçada uma curva de distribuição com base no conjunto de dados (*Smooth curve*), a qual visualmente, pareceu descrever bem os resultados obtidos. Foram comparados os limites de alerta e ação calculados através dos quantis por Gamma-Poisson e *Smooth Curve*, sendo evidenciado que os limites obtidos pelo primeiro são mais amplos que aqueles obtidos pelo segundo, condição na qual se observam mais resultados acima do limite de alerta.

O desenvolvimento desta etapa contribuiu significativamente para o entendimento do conjunto de dados e de monitoramento ambiental e seu comportamento frente às diferentes distribuições, bem como o impacto que pode haver na avaliação da distribuição dos dados quando se considera um período maior do que aquele que é representativo das condições atuais do processo.

4.6 DESENVOLVIMENTO DE ABORDAGEM ESTATÍSTICA PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL DE ÁREAS PRODUTIVAS DE MEDICAMENTOS NÃO-ESTÉREIS

Considerando os resultados e aprendizados obtidos durante a abordagem estatística preliminar, foi desenvolvida uma metodologia para a avaliação dos dados de monitoramento ambiental de áreas não-estéreis. Entretanto, o mesmo conceito poderá ser aplicado para áreas estéreis, dada a tangibilidade dos dois tópicos por tratarem do mesmo conceito de recuperação microbiana em ambiente produtivo.

Conforme observado, o período de tempo a ser selecionado é parte fundamental para resultados estatísticos assertivos. Por este motivo, dois anos de dados foram utilizados como base para a avaliação. Dessa maneira, foram incluídos neste estudo os dados referentes a janeiro de 2016 até dezembro de 2017.

Seguindo o mesmo racional, de maneira a manter neste estudo dados que fossem significativos das condições normais de processo, os *outliers* que puderam ser justificados racionalmente foram excluídos. Esta decisão, além de evitar vieses, ao mesmo tempo, impede que os limites sejam elevados de maneira inadequada, o que poderia prejudicar a estratégia de controle. Assim, resultados altos, que diferiram, significativamente, do grupo, foram avaliados quanto a sua inclusão ou exclusão, considerando que este tipo de ocorrência, usualmente, é seguida de três reamostragens em dias consecutivos. O critério de exclusão abrangeu:

- Qualquer resultado com uma causa especial atribuível e/ou;
- Resultados extremamente altos, seguidos de reamostragem com resultados mais baixos, que se repetiram ao longo dos três dias, indicando que o fato se tratou de uma situação pontual que pode ter sofrido influências de causas especiais, mesmo que não determinadas.

A seguir, será apresentada a abordagem desenvolvida para a determinação de limites de monitoramento ambiental, nas suas diferentes etapas.

4.6.1 Primeiro passo: avaliação de possíveis subgrupos de dados

A avaliação dos dados do Monitoramento Ambiental deve começar com a determinação de subgrupos potenciais que possam existir de acordo com as características em comum das salas, por exemplo, edifício de localização, operações e práticas de limpeza. Esses subgrupos devem ser racionalmente identificados e testados estatisticamente para comprovar suas diferenças significativas. Após a avaliação das áreas, definiu-se que, para este estudo, apenas o tipo de sala poderia ter o potencial de gerar subgrupos, aplicável apenas para amostragem ativa de ar, já que os demais tipos de amostragem apenas são realizados em salas de processo. Embora os mesmos controles de limpeza e partículas transportadas pelo ar sejam aplicados para ambos os tipos de áreas, espera-se que as de não-processo tenham um perfil de dados diferente devido à natureza das atividades que ocorrem nestas áreas e porque algumas delas são projetados para ser uma barreira protetora contra partículas transportadas pelo ar para o acesso à sala de processo (por exemplo, *gownings* e outras antessalas). A fim de provar estatisticamente esta afirmação, uma análise de variância foi realizada para cada indústria, usando gráfico do tipo *Oneway plot charter* (figura 4-12).

Análise de variância e teste t-student são testes comumente utilizados quando se espera comparar se existe diferença estatisticamente significativa entre as médias populacionais de dois ou mais grupos de interesse, considerando a variabilidade dos dados em cada subgrupo e o intervalo de confiança determinado para certo conjunto de dados (MONTGOMERY, 2004). As hipóteses nula e alternativa para esse tipo de teste são, respectivamente:

H_0 : Não existe diferença entre a média populacional dos grupos ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$)

H_1 : A média populacional de pelo menos um dos grupos é diferente dos demais ($\mu_1 \neq \mu_2$ ou $\mu_1 \neq \mu_2$ ou $\mu_2 \neq \mu_3$ ou ... $\mu_i \neq \mu_n$)

A estatística associada à análise de variância é o valor de F. Quando a probabilidade de F é maior que 0,05, rejeita-se a hipótese nula em favor da alternativa (MONTGOMERY, 2004). A tabela 4-2 resume as médias encontradas para cada grupo testado e os resultados da análise de variância.

Para ambas as indústrias, foi comprovado que a diferença entre esses dois subgrupos de dados é estatisticamente significativa ($\text{Prob } F < 0,05$) e, por isso, as salas de não-processo devem ser avaliadas separadamente das salas de processo. Outros tipos de subgrupos podem ser avaliados pela mesma ferramenta e devem ser identificados antes da avaliação da distribuição e do estabelecimento dos limites, a fim de fornecer limites adequados para cada subgrupo de dados.

Amostras de ar passivo e superfície são tomadas apenas em salas de processamento cujas características de limpeza são semelhantes. Por causa disso e para este estudo, nenhum subgrupo racional foi identificado, então todos os dados, por tipo de amostragem, foram ser avaliados em conjunto para cada indústria.

A condição de amostragem, seja ela estática ou dinâmica (durante processo), também pode ser uma fonte de variação na análise estatística, haja vista que alguns documentos regulatórios e farmacopeicos apresentam limites distintos para cada uma das condições (EUROPEAN, 2014b; BRASIL, 2010; ANVISA 2018). Neste estudo, não foi avaliado esse tipo de influência devido ao limitado número de amostragens durante processo, uma vez que apenas uma amostragem anual em condições dinâmicas é requerida por procedimentos locais e que não existe nenhuma regulamentação que aborde este tópico. Desta maneira, para realizar este tipo de avaliação de maneira robusta, seriam necessários dados e recursos adicionais.

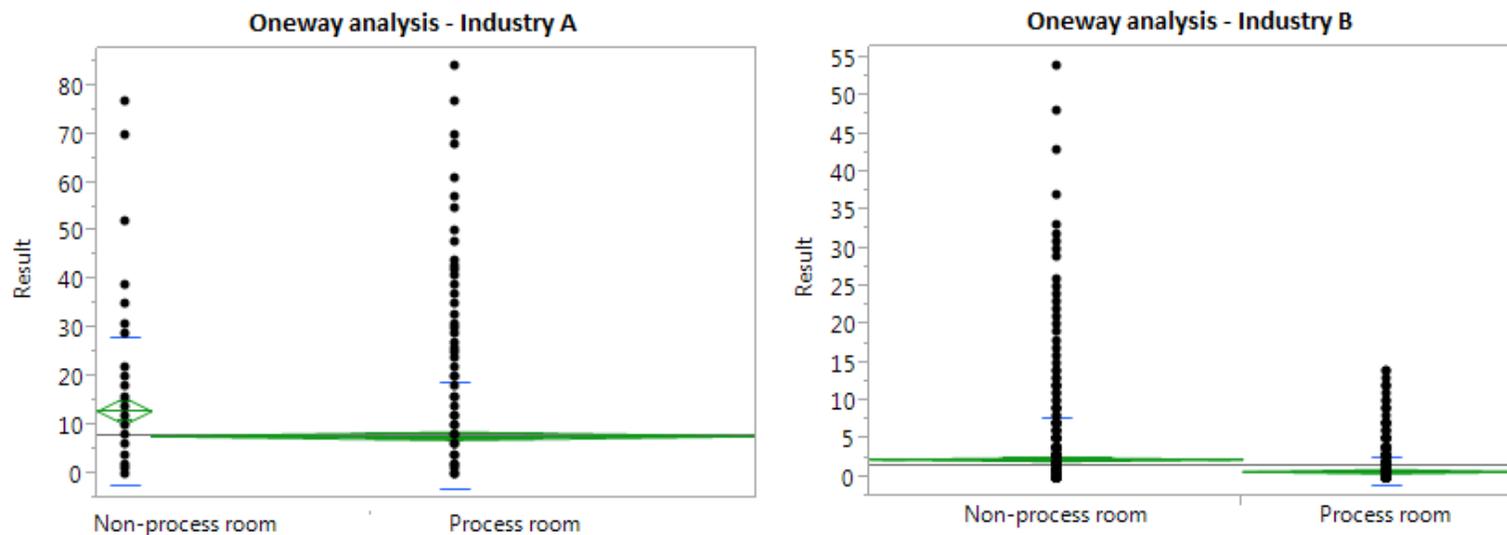


Figura 4-12. Gráficos *Oneway Plot* (*Oneway analysis*) para as Indústrias (*Industry*) A e B para análise de variância entre os grupos de “salas de processo” (*process room*) e de “salas de não-processo” (*non-process room*), quanto aos resultados (*result*) de ar ativo em monitoramento ambiental.

Tabela 4-2. Resumo dos resultados da análise de variância para os subgrupos de dados de ar ativo em monitoramento ambiental para “área de não-processo” e “área de processo”, ambos para as Indústrias A e B.

	Média		Desvio padrão		IC (95%)		Variância Prob>F
	Não-processo	Processo	Não-processo	Processo	Não-processo	Processo	
Indústria A	13,0000	7,8750	1,41	0,42	10,22 a 15,78	7,05 a 8,70	0,0005
Indústria B	2,3317	0,7954	0,12	0,13	2,10 a 2,56	0,53 a 1,06	<0,0001

4.6.2 Segundo passo: abordagens para avaliação da distribuição

Todos os três tipos de amostragem foram avaliados de acordo com o perfil de distribuição. A avaliação visual dos histogramas (Figura 4-13) descreve, claramente, que os resultados do monitoramento ambiental não seguem distribuição normal, pois, apesar de apresentarem apenas uma moda, tendem a apresentar resultados baixos. Embora os dados para produção não-estéril tendam a ter recuperações mais altas do que as áreas assépticas, a maioria dos resultados ainda é baixa. Os dados que seguem a distribuição de Poisson foram previamente descritos como aplicáveis para o Monitoramento Ambiental em áreas assépticas (PRINCE, 2008; WILSON, 1997; SUN et al., 2006) e caracterizam-se por terem média igual à variância, uma vez que esse modelo assume que os dados são uniformemente distribuídos (YANG et al., 2013). No entanto, neste estudo, verificou-se que, para todos os tipos de amostragem, a variância é maior do que a média, o que significa que os dados estão bastante dispersos (YANG et al., 2013). Esse resultado já foi reproduzido por alguns autores para as áreas assépticas (YANG et al., 2013; BAR, 2015), o que é razoável se considerarmos que essa variabilidade deriva da heterogeneidade das populações amostrais, uma vez que diferentes locais e tempos geralmente geram diferentes processos aleatórios (YANG et al., 2013). Nesse caso, o modelo de Poisson pode não ser adequado e tender a subestimar a variabilidade dos dados. Se aplicado na rotina, é possível que mais alarmes falsos em excursões microbianas possam acontecer (YANG et al., 2013). Alguns autores sugeriram corrigir a superdispersão utilizando distribuição binomial Negativa, ou Gamma-Poisson (CHRISTENSEN et al., 2003; HOFFMAN, 2003) uma vez que são uma generalização da distribuição de Poisson, permitindo que a média (λ) varie de acordo com a distribuição gama (γ). O parâmetro adicional na binomial-negativa é capaz de acomodar a superdispersão de forma independente da média (YANG et al., 2013).

Considerando essas informações, a distribuição mais provável para todos os tipos de amostragem incluídos neste estudo seria Gamma-Poisson. Para comprovar estatisticamente esta afirmação, foram aplicados *fit tests* frente às distribuições de Poisson e de Gamma-Poisson aos grupos de estudo

separadamente. Outras distribuições sugeridas na literatura como exponencial, logarítmica e Weibull (PRINCE, 2008) não foram testadas porque não se ajustaram visualmente à distribuição real dos dados.

Como resultado, verificou-se que a distribuição de Poisson não se ajustou a nenhum grupo avaliado para ambas as indústrias. Por outro lado, devido aos resultados do valor de $p \geq 0,05$ para a distribuição Gamma-Poisson, não é possível rejeitar H_0 , que afirma que os dados são da distribuição Gamma-Poisson. Os resultados dos testes de ajuste são apresentados na tabela 4-3.

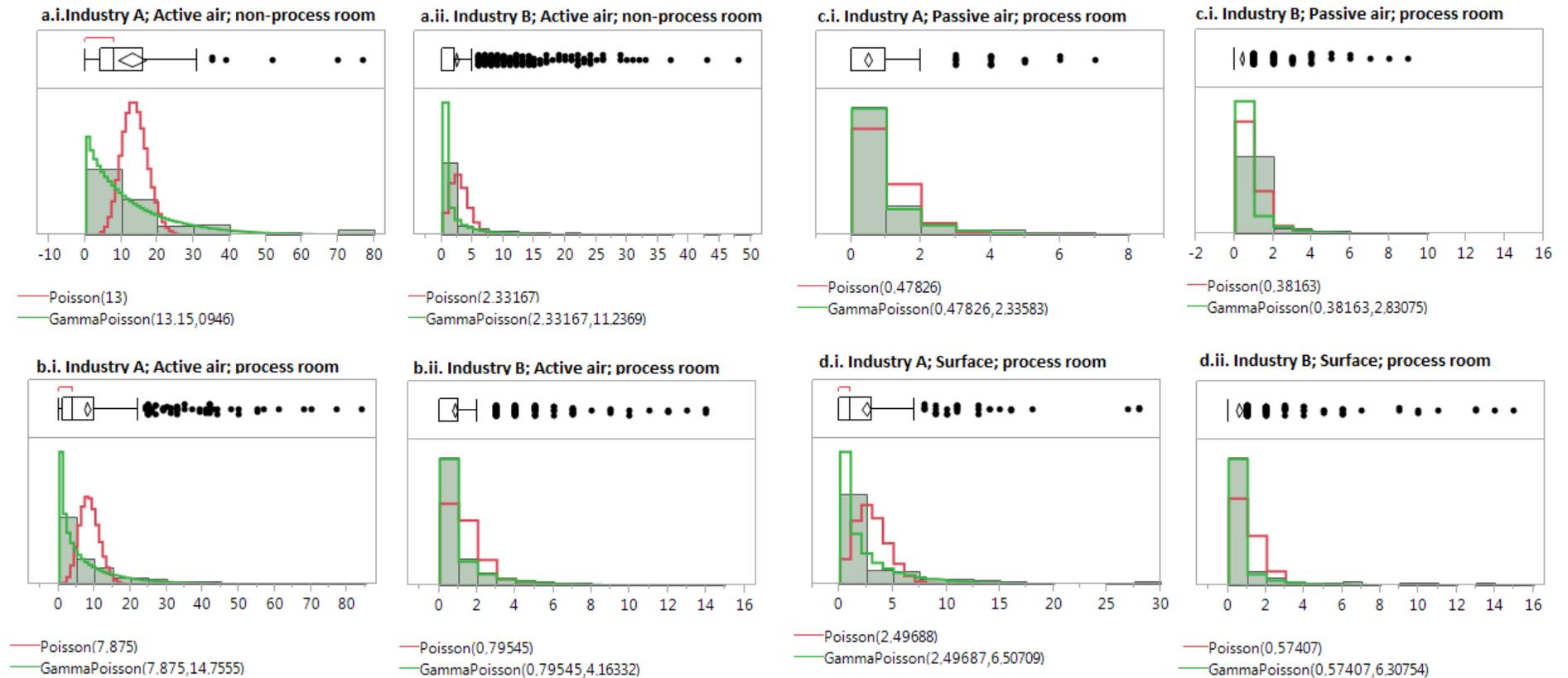


Figura 4-13. Histogramas de a) Amostragem ativa de ar nas salas de não-processo para Indústria A (a.i.) e B (a.ii.); b) Amostragem ativa de ar nas salas de processo para a Indústria A (b.i.) e B (b.ii.); c) Amostragem de ar passivo para a Indústria A (c.i.) e B (c.ii.); d) Amostragem de superfície para a Indústria A (d.i.) e B (d.ii.). Nota: Os valores apresentados entre parênteses são,

respectivamente, o parâmetro estimador λ , “média”, para Poisson e os parâmetros λ , “média” e σ , parâmetro de superdispersão, para Gamma-Poisson. A escala foi ajustada automaticamente pelo software JMP para facilitar a visualização.

Tabela 4-3. Resultados dos testes de ajuste para distribuição Poisson e Gamma-Poisson para Indústria A e B. Nota: H_0 : Os dados são da distribuição testada. Baixo valores de “p” (p-value) rejeitam H_0 .

Grupo	Distribuição de Poisson p-value (prob >X2)		Distribuição de Gamma- Poisson p-value (prob >X2)		Porcentagem de resultados “zero”	
	Indústria A	Indústria B	Indústria A	Indústria B	Indústria A	Indústria B
Ar ativo – áreas de não-processo	< 0,0001	< 0,0001	0,1368	0,4136	9,38% (N=64)	57,50% (N=1200)
Ar ativo – áreas de processo	< 0,0001	< 0,0001	0,3306	0,2481	24,44% (N=720)	69,70% (N=924)
Ar passivo – áreas de processo	< 0,0001	< 0,0001	0,4923	0,3396	73,64% (N=368)	92,04 % (N=490)
Superfície – áreas de processo	< 0,0001	< 0,0001	0,2031	0,7501	42,50% (N=320)	81,89% (N=486)

Yang et al. (2013) descrevem que é importante avaliar a quantidade de ocorrência de resultados “zero”, pois nesses casos, mesmo que atinjam um bom resultado no *fit-test*, a distribuição de Gamma-Poisson pode não descrever adequadamente o conjunto de dados. Visando a aplicação adequada nestes casos, foi desenvolvido o modelo zero-inflacionado (Zero-inflated model), que é mais bem aplicado para áreas assépticas. É possível notar que este formato de distribuição é semelhante ao binomial negativo, exceto pelo fato de que o primeiro tende a se adequar melhor e ser mais preciso (YANG et al., 2013). O modelo não paramétrico também é aceito para definir limites de alerta e ação nessa situação (YANG et al., 2013). Neste estudo, dois grupos da Indústria B tinham mais de 75% de dados zero, sendo assim, prudente, aplicar um destes dois métodos alternativos. Além disso, é importante lembrar que, para todas as abordagens estatísticas, números amostrais (N) maiores são melhores para estimar parâmetros, principalmente quando se considera um modelo não paramétrico. Neste caso, uma menor quantidade de amostras pode representar um risco de serem selecionados *outliers*, resultando em limites de alerta e ação inflados (YANG et al., 2013). Em virtude destas limitações, não serão calculados neste estudo limites de alerta e ação para as condições de grupos zero-inflacionados.

4.6.3 Terceiro passo: Determinação de limites de alerta e ação

A configuração de limites de alerta e ação é estritamente associada à curva de distribuição que melhor representa os dados históricos. Neste sentido, é, especialmente, um desafio para monitoramento ambiental, principalmente quando existem amplos intervalos e quando há limitação de dados disponíveis (WILSON, 1997). Comumente, os pressupostos de distribuição normal são amplamente aplicados para o monitoramento de processos estatísticos, cuja premissa básica é que os dados variam simetricamente em torno da média populacional (μ). Neste caso, os limites de alerta e ação são determinados com base na média do conjunto amostral (\bar{X}) e no seu desvio padrão (S), aplicando as equações 4-5 e 4-6:

Equação 4-5. Equação comumente utilizada usada para determinação de limites de alerta em controle de processos assumindo-se distribuição normal dos dados, com base nos parâmetros média \bar{X} e desvio padrão S amostrais.

$$\text{Limite de Alerta} = \bar{X} + 2S$$

Equação 4-6. Equação comumente utilizada usada para determinação de limites de ação em controle de processos assumindo-se distribuição normal dos dados, com base nos parâmetros média \bar{X} e desvio padrão S amostrais.

$$\text{Limite de Ação} = \bar{X} + 3S$$

Baseado em ambos os cálculos, assume-se que, para distribuição normal, 95,44% dos resultados estarão entre a faixa de $\pm 2\sigma$ com relação à média e que 99,73% estarão na faixa compreendida $\pm 3\sigma$. Dessa maneira, quando um processo está em controle, espera-se que aproximadamente 5% dos resultados estejam acima do limite de alerta e que apenas 0,3% destes estará acima do limite de ação, sendo razoável reagir a uma excursão destes (PRINCE, 2008; MONTGOMERY, 2013).

Para este estudo, observou-se que o conjunto de resultados de monitoramento ambiental são melhor descritos pela distribuição Gamma-Poisson para todos os grupos, caracterizando-se pelo padrão assimétrico e com dispersão dos dados.

A capacidade do processo (Cpk) foi calculada com base no valor que abaixo do qual se encontram 99,865% dos resultados, de acordo com as pré-definições do sistema JMP, frente aos limites determinados pelos guias de boas práticas de fabricação para as áreas de Classe D (EUROPEAN, 2014b, ANVISA, 2013; BRASIL, 2010) conforme segue:

- a) Ar ativo: ≤ 200 UFC/m³
- b) Ar passivo: ≤ 100 UFC/placa
- c) Superfície: ≤ 50 UFC/placa

Como apresentado na tabela 4-4, é possível notar que para todos os grupos, o processo está sob controle ($C_{pk} > 1.3$). Além disso, com exceção do grupo superfície da Indústria A, a capacidade é superior a 2,0, o que significa que os processos são altamente capazes e que o nível 6-sigma de falha é atingido.

Nos casos em que os processos são altamente capazes, quando se considera distribuição normal, é possível determinar níveis mais amplos de alerta e ação, aplicando, ao invés de 2σ e 3σ , os níveis de 3σ e 4σ , respectivamente, que representam as probabilidades de 95,44%, 99,73% e 99,994% que os dados estejam entre limites de controle em condições comuns de processo.

Como os dados deste estudo não seguem a distribuição normal e apenas os limites superiores se aplicam, os níveis de alerta e ação foram determinados calculando os quantis com base nessas probabilidades a partir dos dados históricos, extrapolando o mesmo conceito acima (tabela 4-4). Especialmente para o grupo de superfície, para Indústria A, uma vez que o C_{pk} encontrado é menor que 2,0, os limites de ação e alerta mais restritivos foram aplicados (quantis de 95,44% e 99,73%, respectivamente).

Tabela 4-4. Resultados da análise de capacidade para cada grupo, para $p = 0,9985$ e quantis determinados para cada grupo como sendo limites de alerta e ação. Os resultados são apresentados para a Indústria A / Indústria B, conforme aplicável.

Grupos	(Indústria A / Indústria B)			
	Cpk	Quantis		
		0,9544	0,9973	0,99994
Ar ativo– áreas de não-processo (UFC/m ³)	2,27 / 4,65	-/-	83* / 36*	138** / 72**
Ar ativo– áreas de processo (UFC/m ³)	2,72 / 13,33	-/-	67* / 13*	118** / 25**
Ar passivo (UFC/placa)	12,50 / 11,11	-/-	7* / 7*	14** / 15**
Superfície (UFC/placa)	1,69 / 2,78	11* / -	26** / 15*	- / 34**

Nota: Limites de alerta foram identificados com (*) e limites de ação com (**).

É possível observar que mesmo nos casos em que limites mais amplos foram aplicados, eles ainda estão abaixo dos limites determinados nos guias de boas práticas de fabricação para classe D, o que permite que ações sejam tomadas antes que se atinjam os determinados limites.

Como os limites foram definidos usando parâmetros estimadores, ou seja a partir de dados históricos e não da população como um todo, é necessário avaliar se os mesmos são adequados para prever o comportamento dos dados. Para fazer isso, novos limites foram aplicados no gráfico e o número de excursões potenciais foi contado.

As excursões de alerta em dados dos dois anos estudados não contabilizaram mais do que 4 ocorrências, número atingido no grupo “ar ativo - sala de processo - indústria A”, e não houve nenhuma excursão do nível de ação. Como esperado, exceto para a indústria A, grupo “superfície” houve 10 excursões de alertas e 2 excursões de ação com a aplicação dos novos limites, mesmo sendo aplicados critérios mais estritos na determinação dos limites. Isso deveu-se ao fato de que os resultados observados são relativamente mais altos no período de tempo estudado, o que de maneira positiva, significa que, ao ocorrerem excursões, poderão ser tomadas ações a fim de prevenir recorrências de resultados altos. Nenhum dos resultados se apresentou acima dos limites determinados nos guias BPF para Classe D. Em termos de qualidade de produto e avaliação de custos, é possível aceitar e gerenciar essas situações e, sendo assim, os novos limites são considerados adequados.

4.6.4 Diferenças observadas entre os conjuntos de dados Indústria A e Indústria B

Uma vez que cada instalação de produtiva tende a ter suas próprias particularidades, é razoável que existam algumas diferenças entre os resultados da Indústria A e da Indústria B.

Primeiramente, foi possível observar que a Indústria A possui um número amostral (N) menor que a Indústria B, o que pode ser justificado pelo fato de a primeira possuir uma área produtiva total menor e ser composta por menos salas que a segunda.

Além disso, para Indústria A, as salas de não-processo estão em um número reduzido quando comparadas às suas salas de processo. Já para a Indústria B, ocorre o oposto, sendo as salas não-processo o grupo mais numeroso neste estudo. Isto se dá como reflexo da existência de inúmeras antessalas na Indústria B, como *gownings* (utilizados para entrada e saída de pessoas) e *airlocks* (utilizados para passagem de materiais e equipamentos), as quais estão associadas à maioria das salas de processo. Por outro lado, a Indústria A não dispõe de uma sala separada para vestir e transportar materiais, mas uma área delimitada dentro da própria sala de processamento e, por isso, são tratados como parte integrante da sala de processo.

Embora ambas as indústrias sejam da mesma companhia e estejam em zonas climáticas similares, os dados da Indústria B tendem a ser inferiores aos da Indústria A devido às diferentes práticas de prevenção de entrada de partículas viáveis no ar, como a utilização de um macacão adicional para acessar áreas de fabricação e a própria presença das antessalas para acessar salas de processo.

Por fim, apesar das particularidades listadas, foi possível notar que os resultados de Monitoramento Ambiental de ambas as indústrias são distribuídos por Gamma-Poisson e tiveram bons resultados na avaliação frente aos *fit tests*, o que pode ser um indicativo de que a maioria dos dados de monitoramento ambiental em indústrias com as mesmas características, poderá, potencialmente, ser distribuído conforme modelo Gamma-Poisson. Também é importante mencionar que, mesmo com as diferenças observadas, ambas as instalações estão em conformidade com os limites determinados para Classe D, o que é um reflexo de estratégias de controle implementadas com sucesso.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução deste estudo determinou que os microrganismos mais prevalentes nas áreas produtivas incluídas neste trabalho são predominantemente de origem humana, assim como previamente descrito na literatura, seguidos de microrganismos do solo, representantes das bactérias e dos fungos. Foi possível notar diferenças sazonais mais evidentes apenas para a ocorrência de fungos, que se mostraram mais prevalentes no período seco, além dos diferentes perfis de recuperação entre amostragens de ar e de superfície.

A avaliação estatística dos dados de monitoramento ambiental levou a um melhor entendimento do perfil microbiano das áreas não-estéreis da indústria farmacêutica. A determinação dos limites de alerta e ação de acordo com a distribuição real dos dados levará a uma menor ocorrência de alarmes falsos e, como resultado, evitará tomar ações desnecessárias para resultados de controle, o que economiza custos, retrabalho e tempo.

Este estudo contribuirá com outras empresas que fabricam medicamentos estéreis ou não, de forma a atender às expectativas regulatórias, na implementação e avaliação do programa de monitoramento ambiental.

Difundindo esse conceito, novos estudos contribuirão com a coleta de dados e a descoberta de possíveis particularidades do perfil microbiano de indústrias farmacêuticas de produtos não-estéreis em todo o mundo e a consolidação de informações relativas a dados de distribuição de recuperação em Monitoramento Ambiental.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Salas limpas e ambientes controlados associados**. NBR ISO 14644-1, 2005.
- ABREU, C.S.; PINTO, T.J.A.; OLIVEIRA, D.C. Environmental monitoring: A Correlation study between viable and nonviable particles in clean rooms. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v.58, n.1, p.45-53, 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica**. 2013. Disponível em http://conforlab.com.br/legislacao/qualidade_do_ar_final.pdf. Acesso em 18 de maio de 2018.
- BAR, R. Charting and Evaluation of Environmental Microbial Monitoring Data. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v.69, n.6, p.743-761, 2015.
- BARTNETT, C.; POLARINE JR, J.N.; SHIELDS, D.J. Disinfectant Effectiveness Testing Challenges. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v.71, p.59-65, 2017.
- BIOMERRIEUX, Inc©. **Air Ideal 3P User guide**. United States, 2010. Disponível em https://www.mediray.co.nz/media/15742/om_biomerieux_air-sampling_ot-9630214_user_manual_air_ideal_3p.pdf. Acesso em 18 de maio de 2017.
- BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v.48, n.5, p. 1549–1554, 2010.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, 2010.

CAPUTO, R.A.; HUFFMAN, A. Environmental Monitoring: Data trending using a frequency model. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v.58, p. 254-260, 2004.

CHARNOCK, C. The microbial content of non-sterile pharmaceuticals distributed in Norway. *Journal of Hospital Infection*. v. 57, p.233–240, 2004.

COUNCIL of Europe. **International harmonization**. Disponível em <https://www.edqm.eu/en/international-harmonisation-614.html>. Acesso em 15 julho 2016.

CHRISTENSEN, A., MELGAARD, H. IWERSEN, J. Environmental monitoring based on a hierarchical Poisson-Gamma model. *Journal of Quality and Technology*. v.35, n.3, p.275–285, 2003.

CUNDELL, A.M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v.60, n.2, p.111-123, 2006.

CUNDELL, T. Mold Monitoring and Control in Pharmaceutical Manufacturing Areas. *American Pharmaceutical Review*. Disponível em <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/190686-Mold-Monitoring-and-Control-in-Pharmaceutical-Manufacturing-Areas/>. Acesso em 03 agosto 2017.

EUROPEAN Commission. **EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use: Production**. v. 4, cap.5 Bruxelas, 2014a. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/chapter_5.pdf. Acesso em: 11 novembro 2017.

EUROPEAN Commission. **EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use: Manufacture of Sterile Medicinal Products**. v. 4, Anexo 1, Bruxelas, 2014b. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm. Acesso em: 15 maio 2018.

EUROPEAN Comission. **Targeted stakeholders consultation on the revision of annex 1, on manufacturing of sterile medicinal products, of the Eudralex volume 4.** Disponível em: https://ec.europa.eu/health/human-use/quality/developments/pc_2017_12_sterile_medicinal_products_en.

Acesso em: 10 outubro 2018.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9 ed. Bruxelas: Council of Europe, 2016a, p. 575 a 576.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9 ed. Bruxelas: Council of Europe, 2018a, p. 4336 a 4339.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9 ed. Bruxelas: Council of Europe, 2018b, p. 4339 a 4348.

FARMACOPEIA Brasileira, 5.ed. Brasília, 2010, v.1. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf . Acesso em 18 de maio de 2016.

FDA. Food And Drugs Administration. **Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice.** Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070342.pdf>. Acesso em 17 abril 2018a.

FDA. Food And Drugs Administration. **Inspection Technical Guides - Water Activity (aw) in Foods.** Disponível em <https://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/InspectionTechnicalGuides/ucm072916.htm>. Acesso em 13 setembro 2018b.

HALVORSON, H. O.; ZIEGLER, N. R. Application of statistics in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *Journal of Bacteriology*, v. 25, p. 101, 1932.

HOFFMAN, D. Negative binomial control limits for count data with extra-Poisson variation. *Pharmaceutical Statistics*. v.2, n.2, p.127–132, 2003.

ICH. International Council of Harmonization, ICH Harmonization for Better Health. **The Need to Harmonize**, Disponível em <https://www.ich.org/about/history.html>. Acesso em 10 outubro 2018.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Parenteral preparations**, 15 ed., 2015a. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Ophthalmic preparations**, 15 ed., 2015b. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Topical semi-solid dosage forms**, 15 ed., 2015c. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Liquid preparations for oral use**, 15 ed., 2015d. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Oral powders**, 15 ed., 2015e. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Liquid preparations for oral use**, 15 ed., 2015f. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Liquid preparations for oral use**, 15 ed., 2015g. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

INTERNATIONAL Pharmacopoeia, **Liquid preparations for oral use**, 15 ed., 2015h. Disponível em <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 29 junho 2016.

ISO. International Organization for Standardization. **About ISO**. Disponível em <http://www.iso.org/iso/home/about.htm>. Acesso em 15 julho 2018.

- ISO. International Organization for Standardization. **Cleanrooms and associated controlled environments – Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration**. ISO 14644-1, 2015.
- JAPANESE Pharmacopoeia, 16ed. 2012, p. 2558-2564, disponível em http://lillynetcollaboration.global.lilly.com/sites/CompendialAffairs/pharmlinks/ePharmacopoeias/JP16_S1.pdf. Acesso em 25 maio 2018.
- MANEFFA, A.J., STENNER, R., MATHARU, A.S., CLARK, J.H., MATUBAYASI, N., SHIMIZU, S. Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation. *Food Chemistry*. V.237. p.1133–1138, 2017.
- MILLER, M.J., WALSH, M.R., SHRAKE, J.L., DUKES, R.E., HILL, D.B. Evaluation of the BioVigilant® IMD-A, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles. *PDA Journal of Pharmaceutical and Technology*. v.63. p.259-283. 2009.
- MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. 4ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos Editora S.A, 2004. 513p.
- NOOR, R., ZERIN, N., DAS, K.K. Microbiological quality of pharmaceutical products in Bangladesh: current research perspective. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. v.5, n.4, p.264-270, 2015.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4.ed. Barueri: Manole, 2015. p.204-237.
- PHOENIX, K. e ANDREWS, J. Adopting a Risk - Based Approach to 21 CFR Part 11 Assessments. *Pharmaceutical Engineering*. v.23 n.4, p.70-76, 2003.
- PRINCE, R. Microbiology in Pharmaceutical Manufacturing. *PDA -Parenteral Drug Association*. 2 ed. v.2, Bethesda, 2008.
- RODRÍGUEZ-URREGO, J., HERRERA-LEÓN, S., ECHEITA-SARRIONDIA, A., SOLER, P., SIMON, F., MATEO, S. Nationwide outbreak of *Salmonella*

- serotype Kedougou associated with infant formula. *Euro Surveillace*. v. 15, n.22. p.1-5, 2010.
- SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends and patterns. *PDA Journal of Pharmaceutical and Technology*. v.65, n.4, p. 392-403, 2011.
- SANDLE, T. Approaching Risk Assessment: Tools and Methods. *Global BioPharmaceutical Resources Newsletter*. February, 2012.
- SARUBBI, F.A.; KOPF, H. B.; WILSON, M. B.; MCGINNIS, M. R.; RUTALA, W. A. Increased recovery of *Aspergillus flavus* from respiratory specimens during hospital construction. *American Review of Respiratory Disease*, v.125, n.1, p.33-38, 1982.
- SBCC. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. Monitoramento e Controle Microbiológico. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/revistas_pdf/ed55/10-17%20microbiologia.pdf. Acesso em: 29 outubro 2017.
- SUTTON S. AND JIMENEZ, L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of “Objectionable Organisms.” *American Pharmaceutical Review*. v.15.n.1.p.42-57, 2012
- PORTAL ACTION. Probabilidades: Modelos probabilísticos contínuos - Distribuição Normal. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/probabilidades/62-distribuicao-normal>. Acesso em: 18 setembro 2018.
- SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Disease*, v.49, p.543–551, 2009.
- SUN, X.; KUROSU, S.; SHINTANI, H. The expanded application of most probable number to the quantitative evaluation of extremely low microbial count. *PDA Journal of Pharmaceutical and Technology*, v.60, n.2, p. 124-134, 2006.

- TIDSWELL, E. E MCGARVEY, B. Quantitative Risk Modeling In Aseptic Manufacture. PDA Journal of Pharmaceutical and Technology, v.60, p.267-283, 2006.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018a. p.7297-7298.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018b. p.7298-7301.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018c. p.7305-7312.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018d. p.7312-7325.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018e. p.8674-8711.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018f. p. 5965-5971.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018g. p. 7325-7331.
- UNITED States Pharmacopeia. 41.ed. Washington: United States Pharmacopeial Convention, 2018g. p. 7090-7095.
- WEISER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – Identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology & Biotechnology*, v.93, p.967-974, 2012.
- WHYTE, W. A cleanroom contamination control system. *European Journal of Parenteral Sciences*. v.7, n.2, p.55-61, 2002.
- WHYTE, W., AND EATON, T. Microbiological contamination models for use in risk assessment during pharmaceutical production. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*. v.9, n.1, p.11-15, 2004.

- WILSON, J. Setting alert/action limits for environmental monitoring programs. *PDA Journal of Pharmaceutical and Technology*, v.51, p. 161-162, 1997.
- WILSON, J. Environmental Monitoring: Misconceptions and Misapplications. *PDA Journal of Pharmaceutical and Technology*, v.55, n.3, p. 185-190, 2001.
- YANG, H.; ZHAO, W.; O'DAY, T.; FLEMING, W. Environmental monitoring: Setting Alert and Action Limits Based on a Zero-Inflated Model. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v.67, n.1, p. 2-8, 2013.