

## MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DE ÁREAS GRAU A E GRAU B DE UMA PRODUÇÃO ASSÉPTICA

*Microbiological monitoring of areas Grade A and Grade B of an aseptically production*

Meryele Patrícia Xavier<sup>1</sup>

Hadison Santos Nogueira<sup>1</sup>

Mauro Aparecido de Sousa Xavier<sup>1</sup>

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier<sup>1</sup>

**Resumo: Introdução:** o monitoramento microbiológico representa uma importante ferramenta na avaliação da eficácia das medidas de controle de contaminação, para produtos fabricados em produção asséptica (PA). **Objetivo:** avaliar a prevalência dos micro-organismos isolados, por amostragem ativa de ar e superfície, em áreas grau A e grau B de uma produção asséptica. **Metodologia:** foi realizado o monitoramento microbiológico em condições de repouso e em operação, destas áreas, durante seis meses. Os micro-organismos isolados foram submetidos a métodos de identificação fenotípica e genotípica. **Resultados:** em áreas grau A e B os micro-organismos mais prevalentes foram bactérias. Além disso, os micro-organismos bacterianos estiveram mais prevalentes em amostragens ativa de ar. Os fungos foram mais prevalentes em amostragens de superfície. A população microbiana característica foi composta por bactérias dos gêneros *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus sp*, *Bacillus sp*, *Kocuria sp*, *Leifsonia sp* e por fungos dos gêneros *Scopulariopsis sp*, *Chaetomium sp*, *Moniniella sp*, *Penicillium sp* e *Geomyces sp*. A maior concentração de micro-organismos ocorreu entre os meses de novembro e dezembro. Os limites de alerta e ação para cada ponto de amostragem com maiores níveis de contaminação foram indicados. **Conclusão:** em qualquer ambiente onde operações humanas estão presentes, contaminação microbiana em algum nível é inevitável. Os resultados do monitoramento ambiental devem ser revisados, frequentemente, para assegurar que a instalação opere em um estado validado, garantindo a qualidade e segurança do produto final

**Palavras-chave:** Controle microbiológico; Áreas limpas; Limites de alerta e ação.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES.

Autor para correspondência: Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier.  
E-mail: ericsson\_aerc@yahoo.com.br

Artigo recebido em: 20/05/2017.

Artigo aceito em: 08/06/2017.

Artigo publicado em: 22/12/2017.

**Abstract: Introduction:** the microbiological monitoring is an important tool in assessing the effectiveness of contamination control measures, identifying threats that compromise the quality and safety of products manufactured in aseptic production (AP). **Objective:** evaluate the prevalence of microorganisms isolated from active samples of the air and surface in areas level A and level B of aseptic production. **Methods:** microbiological monitoring was performed at rest in operating conditions of these areas for six months. The isolated microorganisms were subjected to phenotypic and genotypic identification methods. **Results:** in areas level A and B the most prevalent microorganisms were bacteria. Besides that, bacterial organisms were more prevalent in the air sampling. The fungi were more prevalent in surface sampling. The microbial population was composed by bacteria of the genus *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Paenibacillus sp*, *Bacillus sp*, *Kocuria sp*, *Leifsonia sp* and fungi of the genus *Scopulariopsis sp*, *Chaetomium sp*, *Moniniella sp*, *Penicillium sp* and *Geomyces sp*. The highest concentration of microorganisms occurred between the months of November and December. The alert and action limits for each sampling point with higher levels of contamination were indicated. **Conclusion:** in any environment where human operations are present, microbial contamination at some level is inevitable. The environmental monitoring results should be reviewed frequently to ensure that the facility operates in a validated state, ensuring the quality and safety of the final product.

**Keywords:** Microbiological control; Clean rooms; Alert and action limits.

## INTRODUÇÃO

---

Um grande número de produtos estéreis é fabricado por processamento asséptico, que depende da exclusão de micro-organismos na linha de processamento e, portanto, a prevenção da entrada destes em recipientes abertos durante o envase. A carga microbiana do produto e do ambiente de fabricação são fatores importantes relacionados ao nível de garantia de esterilidade destes produtos<sup>1</sup>. A produção de produtos estéreis deve ser realizada em áreas limpas, que devem ser mantidas em um apropriado padrão de limpeza<sup>2</sup>.

Áreas limpas para a produção de produtos estéreis são classificadas de acordo com características requeridas do ambiente. A designação da área limpa em grau A, B, C ou D está baseada na norma de Boas Práticas de Fabricação da União Europeia. De acordo com essa norma, grau A é definido como uma zona de alto risco operacional, grau B como áreas circundantes às de grau A para preparações e envase assépticos. As áreas grau C e D representam áreas limpas, onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis<sup>2,3</sup>.

O monitoramento e o controle microbiológico em zonas limpas e demais áreas críticas do processo de produção de medicamentos fazem parte da rotina de garantia de qualidade nas indústrias farmacêuticas em todo o mundo<sup>4</sup>. O objetivo é medir e avaliar sistematicamente a quantidade de micro-organismos vivos presentes nesses ambientes e orientar medidas preventivas e corretivas para eliminar possíveis focos de contaminação<sup>5</sup>.

Outro objetivo de um programa de monitoramento ambiental é prover uma indicação diária da qualidade microbiana em um ambiente de produção farmacêutica e justificar a liberação dos pro-

ductos<sup>6</sup>. Além disso, o programa de monitoramento permite ser avisado, em tempo, de inconvenientes tendências nas áreas de produção que eventualmente influenciarão adversamente a qualidade dos produtos.<sup>7,8</sup>

A amostragem do ar é a primeira técnica de monitoramento usada para determinar a qualidade do ambiente. A amostragem de superfícies é o segundo aspecto do programa de monitoramento ambiental de viáveis e inclui amostragem de chão, paredes, máquinas, equipamentos e pessoas<sup>9</sup>. Devem ser estabelecidos limites de alerta e de ação para o monitoramento microbiológico. Quando o nível microbiológico, especificado para um ambiente controlado, for excedido, revisão da documentação e investigação devem ocorrer, sendo adotada, entre as ações, a identificação do contaminante microbiano e sua possível fonte<sup>1</sup>.

Não obstante, apesar da importância dos resultados do monitoramento ambiental, tanto para fins de liberação do produto finalizado, quanto para verificação da manutenção do controle do processo e da otimização do sistema, há poucos estudos da microbiota de salas limpas farmacêuticas, publicados nos últimos anos. Contudo, tais estudos são muito úteis para microbiologistas conhecerem os tipos de micro-organismos e a frequência de incidentes mais prováveis de ocorrer em salas limpas podendo, assim, fazer comparações com outros dados coletados por indústrias similares<sup>10</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência dos micro-organismos, isolados por amostragem ativa de ar e amostragem de superfície, em áreas classificadas grau A e grau B de uma produção asséptica.

## METODOLOGIA

---

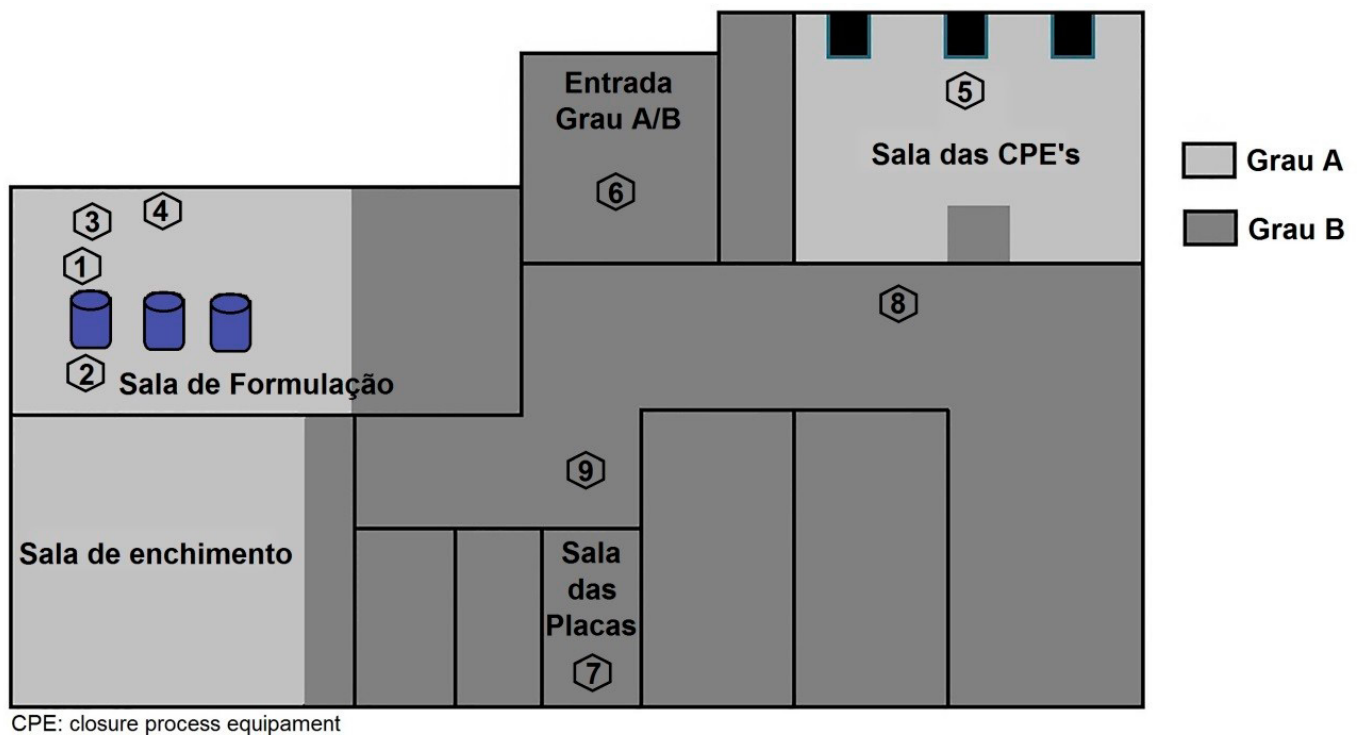
## Escolha das áreas e coleta das amostras

As áreas escolhidas foram áreas grau A e grau B de duas linhas de produção asséptica de um biofármaco, uma vez que nas áreas grau A são realizadas operações de alto risco para a qualidade do produto e as áreas grau B são áreas circundantes à área grau A e funcionam como uma área de proteção ao grau A.

No ambiente de produção em questão, regiões da sala onde estão localizados os tanques de formulação, parte da sala de enchimento e parte da

sala onde ocorre o descarregamento de tampas processadas (lavadas e esterilizadas) no equipamento para processamento de tampas, em inglês *closure process equipment* – CPE, são classificadas como áreas de grau A. Já as partes próximas à porta de saída dessas salas, bem como a sala de entrada do grau A/B, o corredor do grau B, a sala de estocagem de placas contendo meios de cultura, utilizadas no monitoramento ambiental, a sala de estocagem de ferramentas e a antecâmara de entrada de pessoas são classificadas como áreas grau B, conforme apresentado na Figura 1.

**Figura 1 - Pontos de amostragens na área de produção que apresentam maior prevalência de isolados microbianos.**



Os pontos e a frequência de amostragem foram definidos pelo Programa Interno de Monitoramento Ambiental da empresa. As amostras de ar (amostragem ativa do ar) e de superfície foram coletadas de setembro a fevereiro. Neste estudo, não foram realizadas amostragem de pessoas.

## Isolamento e identificação microbiológica - Fenotipagem

Cada amostragem ativa de ar foi coletada, durante uma hora (volume de mil litros de ar), utilizando-se placas de petri 14cm de diâmetro, contendo meio de cultura Agar Soja Trypticaseína (AST) irradiado, acopladas ao sistema amostrador ativo de ar (Slit sample®). As amostras de superfície foram obtidas através do contato direto das placas Rodac (Replicate Organism Detection and Counting), contendo meio de cultura AST com a superfície

amostrada. As placas amostradas foram incubadas à temperatura de 30°C a 35°C, durante, no mínimo, 72 horas. Após a incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os dados foram registrados em formulários específicos.

As colônias, isoladas nas placas, foram fenotipadas por macroscopia e microscopia, conforme métodos microbiológicos padrão, seguidos no laboratório de controle de qualidade microbiológica da indústria. Após o período de incubação, foi realizado a análise macroscópica quando foi observado o tamanho da colônia (medida do diâmetro em milímetro, utilizando uma régua), forma da colônia, coloração da placa (frente e verso). Em seguida, foi realizada a análise microscópica quando foi observada a forma (redondo, oval, claviforme, reniforme, forma de banana, forma de milho, dentre outros), presença de septo e aspecto da superfície (lisa, áspera, etc.). Os resultados foram registrados em formulários de análise e usados para definir o gênero do microrganismo. Fungos e leveduras foram identificados somente através de métodos fenotípicos. As bactérias, após o período de incubação e análise fenotípica, foram identificadas através de método genotípico.

### Identificação molecular – Genotipagem

O DNA genômico das colônias de bactérias fenotipadas foi isolado, utilizando o reagente de extração PrepMan™ Ultra Amostra, conforme instruções do fabricante Applied Biosystem. As regiões gênicas 16S rDNA (bactérias) dos microrganismos foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador GeneAmp 9600 (Applied Biosystem). Foram amplificados os primeiros 500 pares de bases da região gênica 16S rDNA. Para a realização da PCR, foi utilizado o kit *MicroSeq® 500 16S rDNA Bacterial Identifi-*

*cation* (Applied Biosystem), conforme instruções do fabricante. Como controle positivo, foi utilizado DNA da cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 53503. Os amplicons foram submetidos à eletroforese e reações de sequenciamento no *Applied Biosystem Genetic Analyzer®*, utilizando o kit *MicroSeq® 500 16S rDNA Sequencing*, conforme instruções do fabricante. Os amplicons sequenciados foram submetidos à análise computacional, utilizando o *MicroSeq® ID Analysis Software* (Applied Biosystem). Foi gerada uma lista com percentuais de semelhança da comparação entre as sequências consenso dos amplicons sequenciados e a biblioteca do *Microseq®* (Microseq ID 16S rDNA 500 V2.2 library). O nível espécie só foi considerado quando os percentuais de semelhança dos amplicons com as sequências depositadas na livreria do *Microseq®* foram iguais ou superiores a 99% de identidade.

### Análise dos dados

Os resultados das amostragens do monitoramento ambiental, realizadas conforme determinado pelo Programa de Monitoramento Ambiental, foram exportados para uma planilha Microsoft® Office Excel versão 2010, quando foi analisada a prevalência de contaminação microbiológica de bactérias e fungos isolados por amostragem de superfície e ar (amostragem ativa) em áreas grau A e grau B. Os pontos de amostragem na área de produção que apresentaram maior prevalência de contaminação e a sazonalidade microbiana, no período de coleta dos dados, foram utilizados para a construção de tabelas e figuras.

## RESULTADOS

O monitoramento microbiológico de micro-

organismos em condições de repouso (estático) e em operação (dinâmico) foi realizado em áreas classificadas como grau A e B de uma indústria farmacêutica, durante seis meses, como parte de seu programa de monitoramento ambiental. O gênero, espécie (quando possível) e total de unidades formadoras de colônias (UFC) dos micro-organismos mais prevalentes, isolados durante as amostragens ativas de ar e amostragens de superfícies das áreas grau A e das áreas grau B, estão apresentados, respectivamente, na Tabela 1 e na Tabela 2.

**Tabela 1 - Total de UFC de bactérias e fungos mais prevalentes em amostragens ativas de ar e amostragens de superfície de áreas grau A.**

Bactérias	Grau A	
	Ar (n= 8074)	Superfície (n= 10025)
<i>Micrococcus luteus</i>	4	Ausente
<i>Paenibacillus sp</i>	1	Ausente
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Ausente	2
<i>Staphylococcus hominis</i>	Ausente	1
<i>Leifsonia sp</i>	Ausente	1
<b>Total Fungos</b>	5	4
<i>Scopulariopsis sp.</i>	Ausente	1
<i>Geomyces sp.</i>	Ausente	1
<b>Total</b>	0	6
<b>Total de micro-organismos</b>	5	6

n: número de amostragens; UFC: unidades formadoras de colônias.

**Tabela 2 - Total de UFC/m<sup>3</sup> de bactérias e fungos mais prevalentes em amostragens ativas de ar e amostragens de superfície de áreas grau B.**

Bactérias	Grau B	
	Ar (n= 6727)	Superfície (n= 8691)
<i>Micrococcus sp</i>	784	6
<i>Staphylococcus sp</i>	266	12
<i>Bacillus sp</i>	62	15
<i>Kocuria sp</i>	38	Ausente
<b>Total Fungos</b>	1150	33
<i>Scopulariopsis sp</i>	2	176
<i>Chaetomium sp</i>	Ausente	72
<i>Moniliella sp</i>	41	1
<i>Penicillium sp</i>	4	22
<b>Total</b>	47	271
<b>Total de micro-organismos</b>	1197	304

n: número de amostragens; UFC: unidades formadoras de colônias.

Foram realizadas 8074 amostragens ativas de ar nas áreas grau A e isolados 5 UFC de micro-organismos, sendo todos classificados como bactérias. Em superfície, foram 10025 amostragens em áreas grau A e 6 UFC de micro-organismos isolados. Desses, 4 UFC foram de bactérias e 2 UFC foram de fungos (Tabela 1).

Em áreas grau B, foram realizadas 6727 amostragens ativas de ar e isolados 1150 UFC de bactérias e 47 UFC de fungos. Em superfície, foram 8691 amostragens realizadas e foram isolados 304 UFC de micro-organismos. Desses, 33 UFC foram de bactérias e 271 UFC foram de fungos (Tabela 2).

A população microbiana, isolada em amostragens ativas de ar em áreas grau A, constituiu-se principalmente de bactérias dos gêneros *Micrococcus sp* e *Paenibacillus sp* (Tabela 1). Já a população microbiana isolada em amostragens de superfície em áreas grau A, foi constituída por bactérias dos gêneros *Staphylococcus sp* e *Leifsonia sp* e de fungos dos gêneros *Scopulariopsis sp* e *Geomyces sp*.

Em áreas grau B, a população microbiana, isolada em amostragens ativas de ar, constituiu-se principalmente de bactérias dos gêneros *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp* e *Kocuria sp* e de fungos dos gêneros *Scopulariopsis sp*, *Moniliella sp* e *Penicillium sp*. Já a população microbiana, isolada em amostragens de superfície em áreas grau B, consistiu, principalmente, de bactérias dos gêneros *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp* e *Bacillus sp* e de fungos dos gêneros *Scopulariopsis sp*, *Chaetomium sp*, *Moniliella sp* e *Penicillium sp* (Tabela 2).

De acordo com os resultados, tanto em áreas grau A quanto em áreas grau B, os micro-organismos mais prevalentes foram bactérias. Além disso, os micro-organismos bacterianos estiveram mais prevalentes em amostragens ativas de ar do que em amostragens de superfície. Já os fungos foram mais

prevalentes em amostragens de superfície do que em amostragens de ar.

Comparando o número de isolados de micro-organismos da Tabela 1 com a Tabela 2, percebe-se um aumento da contaminação microbiana em áreas grau B quando comparadas com a contaminação microbiana em áreas grau A.

Os maiores níveis de contaminação de áreas grau A ocorreram em quatro pontos de amostragem da sala dos tanques de formulação (suporte fixado acima do tanque; ao lado da tubulação em frente ao tanque A; piso da plataforma em frente ao tanque A e parede ao lado do sistema de purga; sistema que retira o ar do filtro esterilizante) e em um ponto de amostragem da sala de descarregamento da CPE (superfície da seladora da CPE), como demonstrado na Figura 1.

Em áreas grau B, os maiores níveis de contaminação ocorreram em um ponto de amostragem da sala de entrada do grau A/B (centro direito da sala), em um ponto da sala de estocagem de placas (meio da sala) e em dois pontos do corredor do grau B (ao lado da sala de descarregamento da CPE e ao lado da sala de estocagem de placas), conforme Figura 1.

Segundo Brasil<sup>1</sup> (2010), deve ser estabelecido limites de alerta e de ação para o monitoramento microbiológico. Estes limites são variáveis, tendo diferentes valores de acordo com a área de produção, como pode ser observado na Tabela 3, em que os limites de alerta e de ação, para cada ponto de amostragem com maiores níveis de contaminação, estão indicados.

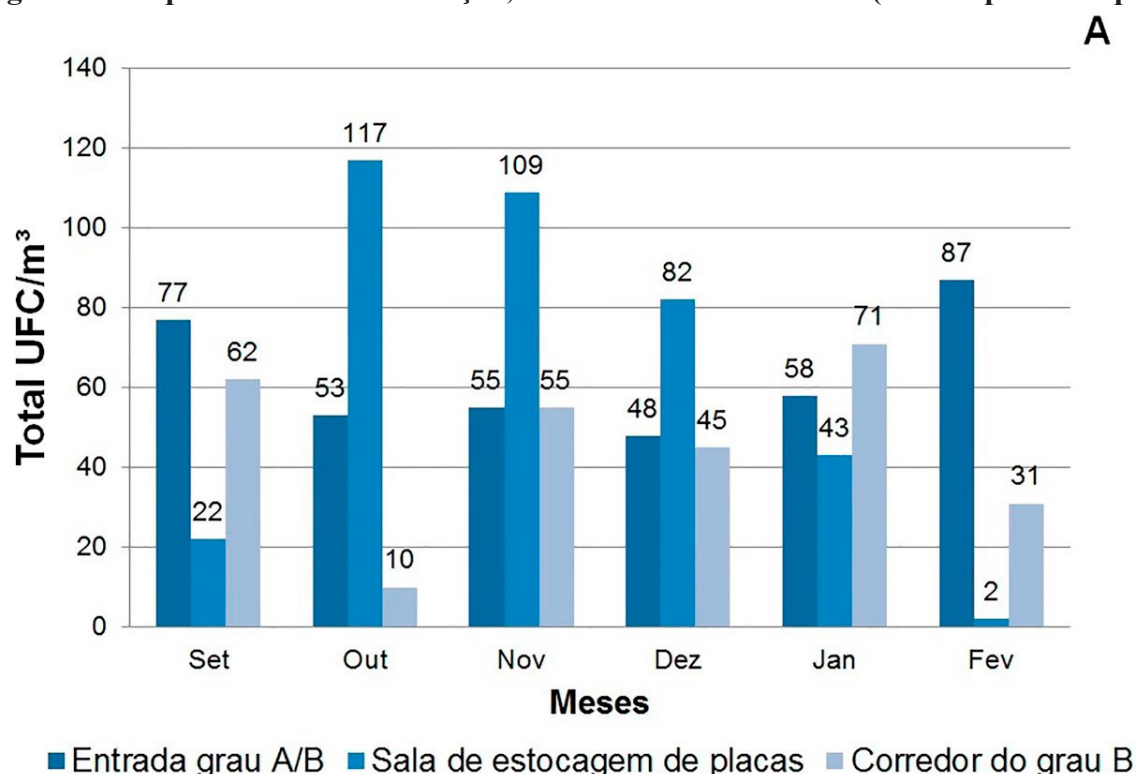
A sazonalidade microbiana foi avaliada nas áreas grau A e nas áreas grau B onde surgiram os maiores índices de contaminação microbiana. A Figura 2A e a Figura 2B indicam os valores totais de UFC isoladas em condições de repouso e operação, no período de seis meses de amostragens. A maior

concentração de micro-organismos em áreas grau A ocorreu no mês de dezembro (5 UFC). Em áreas grau B, a maior concentração de micro-organismos ocorreu no mês de novembro (219 UFC).

**Tabela 3 - Nível normal, limite de alerta e limite de ação (UFC) dos pontos amostrados nas áreas com maiores níveis de contaminação.**

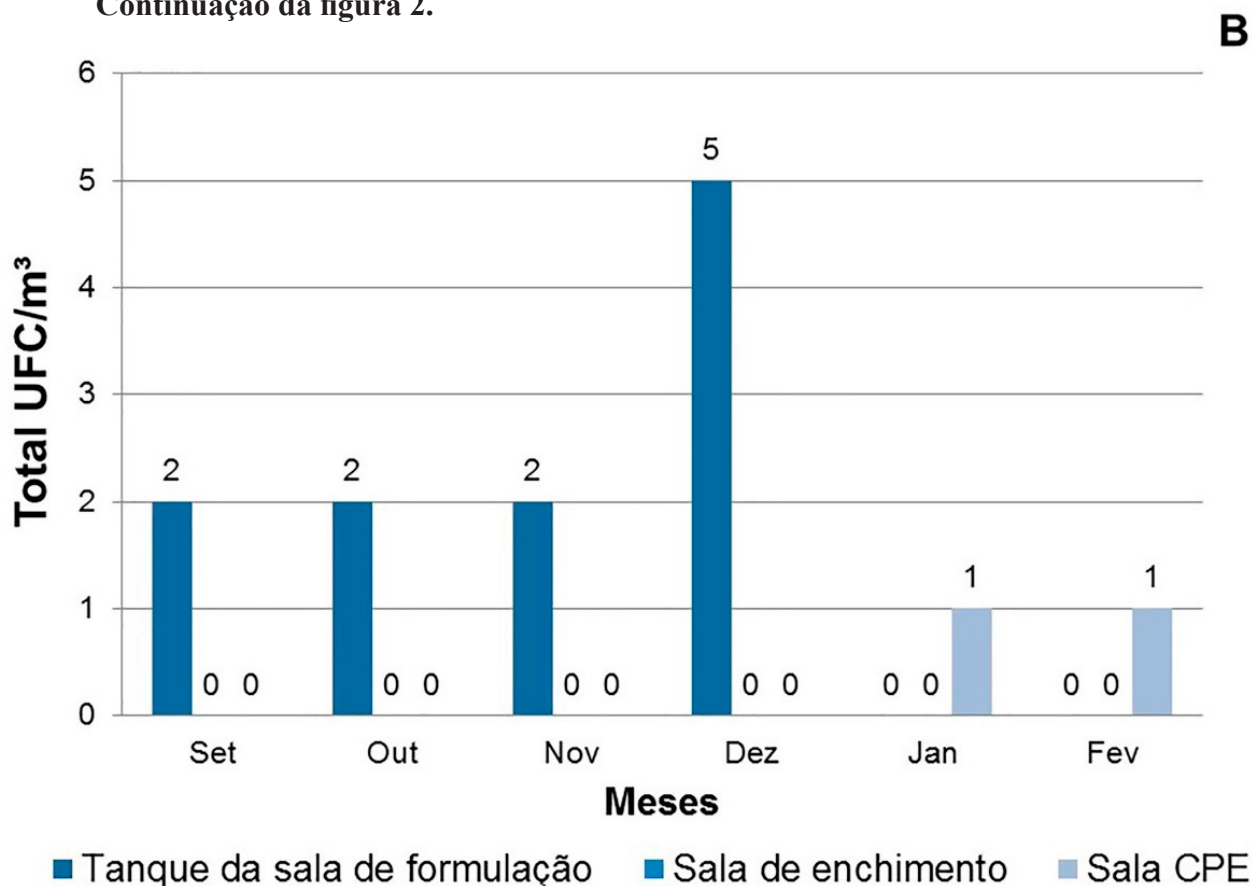
Local de amostragem	Nível normal	Limite de alerta	Limite de ação
<b>Sala de formulação</b>			
Suporte fixado acima do tanque piso da plataforma em frente ao tanque (grau A)	<1	-	≥1
Ao lado da tubulação em frente ao tanque (grau A)	<1	-	≥1
Piso da plataforma em frente ao tanque (grau A)	<1	1 ≤ X ≤ 5	>5
Parede ao lado do suporte de purga (grau A)	<1	-	≥1
<b>Sala da CPE</b>			
Superfície da seladora da CPE (grau A)	<1	-	≥1
<b>Entrada do grau A/B</b>			
Centro direito da sala (grau B)	<1	1 ≤ X ≤ 10	>10
<b>Sala das placas (estocagem das placas)</b>			
Meio da sala (grau B)	<1	1 ≤ X ≤ 10	>10
<b>Corredor do grau B</b>			
Ao lado da sala de descarregamento da CPE (grau B)	<1	1 ≤ X ≤ 10	>10
Ao lado da sala de estocagem de placas (grau B)	<1	1 ≤ X ≤ 10	>10

**Figura 2 - Total UFC (unidade formadora de colônias) isoladas durante setembro a fevereiro. Fig. 2A: amostragens da entrada do grau A/B, da sala de estocagem de placas e corredor do grau B. Fig. 2B: amostragens no tanque da sala de formulação, sala de enchimento e CPE (closure process equipment).**





Continuação da figura 2.



## DISCUSSÃO

O monitoramento ambiental sobre o tipo e quantidade de micro-organismos encontrados em salas limpas podem fornecer informações essenciais para o entendimento deste ambiente e auxiliar com o controle da contaminação<sup>10</sup>.

Apesar da importância dessa informação, há poucos estudos que descrevem os micro-organismos, encontrados em salas limpas farmacêuticas, publicados nos últimos anos<sup>10</sup>. Desta forma, é difícil fazer uma comparação entre os dados deste estudo e dados de outros<sup>9</sup>.

A população microbiana característica identificada nas áreas monitoradas, no presente estudo, foi composta das bactérias dos gêneros *Micrococcus sp*, *Paenibacillus sp*, *Stahylococcus sp*, *Leifsonia sp*, e *Bacillus sp* e *Kocuria sp*, com a predo-

minância de *Micrococcus luteus* em áreas grau A e *Micrococcus sp* em áreas grau B.

O *Micrococcus luteus* é uma das bactérias que existem na água de sistemas industriais e apresenta alto potencial para formação de biofilme, podendo causar sérios problemas ao sistema de água<sup>11,12</sup>. Além disso, cepas de *M. luteus*, altamente resistentes à radiação, têm sido isoladas e descritas na literatura, o que resulta no comprometimento da eficácia na esterilização de ambientes industriais e hospitalares<sup>13</sup>.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, composta de 33 espécies, das quais 17 podem ser encontradas em amostras biológicas humanas. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose, como em anaerobiose, e nisso se diferenciam dos micro-organismos do gênero *Micrococcus*, que só fermen-

tam em aerobiose. Os *Staphylococcus sp* sofrem facilmente mutações, adquirindo, assim, resistência a diferentes agentes antimicrobianos e sanitizantes. Portanto, é de extrema relevância o rodízio de sanitizantes para uma efetiva desinfecção de ambientes hospitalares e industriais, uma vez que estes micro-organismos estão ali presentes<sup>14</sup>.

Um estudo sobre o monitoramento microbiológico de salas limpas no desenvolvimento de vacinas revelou, também, que *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp* e *Bacillus sp* fizeram parte da população microbiana, característica identificada nas áreas monitoradas no estudo<sup>9</sup>.

Wu e Liu<sup>15</sup> (2007) em um estudo feito em áreas limpas de uma produção farmacêutica asséptica, com amostras de ar, pessoas e superfície, concluíram que bactérias amplamente distribuídas nas áreas limpas são gram-positivas.

Outro trabalho, que revisou a microbiota presente em salas limpas de várias indústrias farmacêuticas, concluiu que o microrganismo mais comum em salas limpas são bactérias gram-positivas, incluindo *Micrococcus sp*, *Staphylococcus sp* e *Bacillus sp*, dentre outros. Apresentou, ainda, que há uma associação entre os micro-organismos, comumente encontrados em salas limpas, e aqueles que são transitórios na pele de humanos<sup>10</sup>.

Ambientes que são essencialmente livres de operações humanas, geralmente, têm baixas taxas de contaminação inicial e mantêm baixos níveis de contaminação microbiana. Os estudos mostram, de maneira conclusiva, que os operadores, mesmo quando cuidadosamente e corretamente paramentados, permanentemente liberam micro-organismos no meio<sup>14,15,16</sup>.

A predominância de bactérias gram-positivas revela que os operadores, mesmo estando completamente paramentados, precisam de um extensivo treinamento em técnicas assépticas<sup>9</sup>. Bactérias derivadas da pele de humanos, como os cocos gram-positivos, podem indicar pobres técnicas de

vestimenta, a falta de técnicas assépticas e extensas intervenções humanas nas áreas assépticas<sup>17</sup>.

Apesar da prevalência maior de bactérias nas áreas grau A e grau B, neste trabalho, entretanto, fungos também foram isolados (Tabelas 1 e 2). O isolamento de fungos pode estar associado com pobre controle da umidade e/ou danos na instalação de água<sup>17</sup>. O gênero fúngico *Scopulariopsis* foi isolado em grau A e grau B, sendo mais prevalente no grau B (Tabela 2). Abdel *et al*<sup>18</sup> (2004) publicaram um estudo de caso sobre a qualidade do ar interior, durante ações de renovação, onde também foram isolados fungos do gênero *Scopulariopsis*.

Diversos autores associaram a presença de fungos a problemas de desgaste dos materiais de construção das instalações, devido à umidade do ar. Os fungos são responsáveis por várias infecções, especialmente em pessoas imunocomprometidas. Além da sua importância médica, estes organismos estão associados com a contaminação das superfícies e a deterioração de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos. A contaminação por fungos de produtos farmacêuticos pode causar não só sérios prejuízos econômicos para o fabricante, mas, também, pode levar a sérios problemas de saúde dos consumidores<sup>19,20</sup>.

Os micro-organismos bacterianos foram mais prevalentes em amostragens de ar do que em amostragens de superfície, neste trabalho. Nossos achados estão de acordo com o estudo feito por Sandle<sup>10</sup> (2011), que descreveu que cocos gram-positivos ocorrerem mais frequentemente em amostras de ar. Segundo este autor, isso está relacionado com a presença de pessoas, principais fontes de contaminação, nas salas limpas. As pessoas liberam fragmentos da pele contendo microrganismo e, assim, estes são os tipos mais prováveis de micro-organismos a serem encontrados no ar (de livre flutuação ou mais provavelmente ligado a partículas de pele ou pó).

Pereira<sup>14</sup> (2009) considera as portas das sa-

las como pontos críticos no que se refere ao monitoramento microbiológico de áreas classificadas. O autor enfatiza que a simples abertura das portas pode carrear micro-organismos de ambientes menos classificados, com um número de micro-organismos viáveis maior, para um ambiente mais limpo. O diferencial de pressão existente entre as áreas, normalmente impede o fluxo de ar de um ambiente mais sujo para um mais limpo, mas nem sempre esta ação é totalmente eficaz. As portas, também, são locais de passagem de pessoal e materiais que são utilizados nos processos industriais e, por este motivo, a tendência de contaminações microbiológicas, oriundas destes vetores, é grande.

A menor incidência de contaminação microbiana encontrada em áreas grau A, quando comparadas com os resultados encontrados nas áreas grau B, pode ser explicado por serem as áreas grau A ambientes mais críticos, onde há um fluxo laminar unidirecional e pressão positiva entre as áreas grau A e grau B.

A sazonalidade microbiana avaliada nas áreas grau A e nas áreas grau B, nos meses de setembro a fevereiro, apresentou uma maior concentração de micro-organismos em áreas grau A no mês de dezembro e em áreas grau B, no mês de novembro. Um estudo realizado em 50 salas limpas para a produção de produtos médicos estéreis isolou e identificou bactérias durante 2005 e 2006, de acordo com a estação do ano e a sala limpa em que eles foram isolados. Tal estudo analisou a hipótese de que a estação do ano poderia interferir no nível de contaminação. Entretanto, concluíram que a variação no nível de contaminação ao longo das estações não foi significativa<sup>21</sup>.

Nesse estudo, na área grau A foi identificado um maior nível de contaminação no verão, e, na opinião dos autores, isso poderia ter sido causado por um possível problema com os agentes sanitizantes

empregados ou uma mudança no programa de limpeza, uma vez que a bactéria mais isolada foi uma forma esporulada de bacilo gram-positivo.

Pacheco e Pinto<sup>21</sup> (2010) sugerem que quando um resultado excede o nível normal de contaminação, estabelecido para a área amostrada, este não deve ser associado à estação do ano em que a amostragem foi realizada, mas sim a alguma outra variável que tenha influência direta sobre o nível de contaminação, como, por exemplo, presença de pessoas e análise do cumprimento das boas práticas de fabricação. Desta forma, revisão da documentação e investigação devem ocorrer, incluindo a revisão da documentação de manutenção da área, da documentação de desinfecção, dos parâmetros físicos ou operacionais inerentes (tais como mudanças de temperatura e umidade relativa) e o estágio do treinamento dos funcionários envolvidos<sup>1,22,23</sup>.

## CONCLUSÃO

Um bom programa de controle microbiológico começa com a compreensão dos riscos de contaminação microbiana no processo de fabricação e identificação de possíveis tipos de contaminantes. Desse modo, a identificação do microrganismo auxilia no reconhecimento da possível fonte de contaminação e, assim, propicia o desenvolvimento de um melhor mecanismo de controle microbiológico sobre a linha de produção asséptica<sup>24</sup>.

A maior concentração de micro-organismos isolados de áreas grau A em dezembro foi analisada em uma investigação e documentada em relatório de análise de tendência do monitoramento ambiental da empresa. Os micro-organismos identificados foram *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus haemolyticus*, ambos cocos gram-positivos, o

que sugere pessoas como fonte de contaminação. Já em áreas grau B, a prevalência maior ocorreu no mês de novembro, sugerindo que um aumento do nível de contaminação em uma sala limpa pode não está relacionada somente à contaminação na área circundante. Apesar de apresentar um nível de contaminação acima do normal, a investigação concluiu que não houve impacto para a qualidade do produto.

Em qualquer ambiente onde operações humanas estão presentes, contaminação microbiana é, em algum nível, inevitável. Assim, uma expectativa de zero contaminação em todos os locais, durante cada operação do processamento asséptico, não é tecnicamente possível e é irreal. Com isso, resultados do monitoramento ambiental devem ser revisados frequentemente para assegurar que a instalação opera em um estado validado e para fins de liberação do produto terminado<sup>23</sup>. Isso se deve ao fato de não haver zero contaminação. Para tal, é necessário o estabelecimento de limites de alerta e de ação. Por isso, a detecção e a identificação dos micro-organismos devem ser feitas de forma rápida e precisa, tornando o controle mais efetivo, prevenindo falhas na liberação dos lotes que podem representar perda da credibilidade da empresa e até mesmo provocar problemas de saúde nos pacientes.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Montes Claros e a indústria farmacêutica onde foi realizado o trabalho.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº17 de 16 de abril de 2010 – Boas práticas de fabricação de medicamentos. *Diário Oficial da União*, 19 abr. 2010. Seção I, p. 94-110.
2. EUROPEAN COMMISSION. The rules governing medicinal products in the European Union. Volume 4 – EU guidelines for good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use. 2008. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm)> Acesso em 18 de jun. 2016.
3. XAVIER, M. P. *et al.* Importância do monitoramento ambiental em áreas classificadas. *Revista de Biologia e Farmácia*. v. 9, n. 4, out-dez. 2013.
4. 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. 264-70, abr. 2015.
5. COUTO, M. Monitoramento e controle microbiológico. *Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*. v. 55, p. 10-14, nov-dez. 2011.
6. RUBIO, S. *et al.* Evaluation of the MicroWorks, Inc. Swab Sampling System (MSSSTM) for use in performing quantitative swab sampling. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 64, n. 2, p. 167-81, mar-abr. 2010.

7. GORDON, O. *et al.* Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 68, n. 5, p. 394-406. set-out. 2014.
8. HALEEM, R. M. *et al.* Quality in the pharmaceutical industry - a literature review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. v. 23, n. 5, p. 463-9, out. 2015.
9. UTESCHER, C. L. A. *et al.* Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 38, n. 4, p. 710-16, out. 2007.
10. SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 65, n. 4, p. 392-403, jul-ago. 2011.
11. CYRANKA, B. *Otimização do processo de descontaminação no sistema isolador de Bio-mangueiros*. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
12. MATSUURA, K. *et al.* Detection of *Micrococcus luteus* biofilm formation in microfluidic environments by pH measurement using an ion-sensitive field-effect transistor. *Sensors*. v. 13, n. 2, p. 2484-93, fev. 2013.
13. DENG, W. *et al.* 2016. Radiation-resistant *Micrococcus luteus* sc1204 and its proteomics change upon gamma irradiation. *Current microbiology*. v. 72, n. 6, p. 767-75, jun. 2016.
14. PEREIRA, C. C. *Identificação da microbiota presente em áreas classificadas de produção de uma indústria farmacêutica*. 2009. 72 f. Dissertação (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
15. WU, G. F.; LIU, X. H. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. *Journal of Zhejiang University- Science B*, v. 8, n. 9, p. 666-72, set. 2007.
16. SHUKLA, A.; VISHNOI, G.; DAS, D. Current good manufacturing guidelines for medicinal product. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. v. 6, n. 2, p. 57-61, mar. 2016.
17. CUNDELL, A. M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 60, n. 2, p. 111-23, mar-abr. 2006.
18. ABDEL, H. A. A.; YASSER, I. H.; KHODER, I. M. Indoor air quality during renovation actions: a case study. *Journal of Environmental Monitoring*. v. 6, n. 9, p. 740-4, ago. 2004.
19. JIMENEZ, L. Molecular applications to pharmaceutical processes and cleanroom environments. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 65, n. 3, p. 242-53, mai-jun. 2011.
20. VIJAYAKUMAR, R.; AL-ABOODY, M. S.; SANDLE T. A review of melanized (black) fungal contamination in pharmaceutical products-incidence, drug recall and control measures.

*Journal of Applied Microbiology*. v. 120, n. 4, p. 831-41. abr. 2016.

21. PACHECO, F.L.; PINTO, T. J. The bacterial diversity of pharmaceutical clean rooms analyzed by the Fatty Acid methyl ester technique. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 64, n. 2, p. 156-66, mar-abr. 2010.
22. SHINTANI, H. Validation studies for microbial contamination and control of contaminants. *Biocontrol Science*. v. 20, n. 3, 161-70. 2015.
23. GOUVEIA, B. G. *et al.* Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. v. 7, n. 2, p. 87-96, abr-jun. 2015.
24. SHINTANI, H. Validation study on how to avoid microbial contamination during pharmaceutical production. *Biocontrol Science*. v. 20, n. 1, p. 1-10. 2015.