



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Instituto de Química

Guilherme Neves Ferreira

BIOAEROSSÓIS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Rio de Janeiro
2009

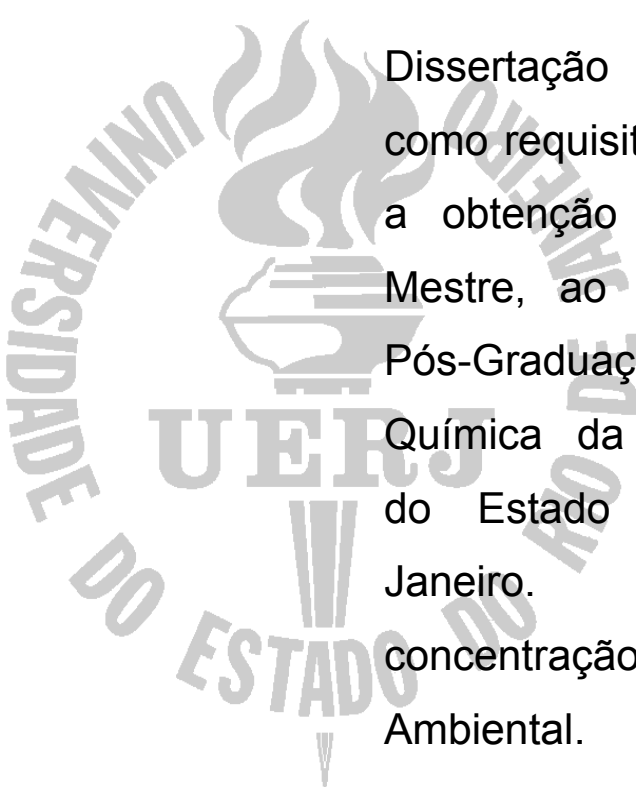
Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Guilherme Neves Ferreira

BIOAEROSSÓIS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



Dissertação apresentada,
como requisito parcial para
a obtenção do título de
Mestre, ao Programa de
Pós-Graduação em
Química da Universidade
do Estado do Rio de
Janeiro. Área de
concentração: Química
Ambiental.

Orientador: Prof. Sérgio Machado Corrêa

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/NPROTEC

F383 Ferreira, Guilherme Neves.
 Bioaerossóis na indústria farmacêutica / Guilherme Neves
 Ferreira. – 2009.
 90 f.

Orientador : Sérgio Machado Corrêa.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Química.

1. Ambientes de indústria farmacêutica – Microbiologia –
Teses. I. Corrêa, Sérgio Machado. II. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU 579.66

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação.

Assinatura

Data

Guilherme Neves Ferreira

BIOAEROSSÓIS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental

Aprovado em:

Prof. Dr. Sérgio Machado Corrêa (orientador)
Faculdade de Tecnologia da UERJ

Profa. Dra. Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues
Faculdade de Tecnologia da UERJ

Profa. Dra. Simone Lorena Quitério
IFRJ – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Rio de Janeiro – Departamento de Meio Ambiente

Rio de Janeiro

2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avôs; João e Marino; minhas avós, Rita e Elza, aos meus pais; Haydée e Levy, que me educaram e me incentivaram a buscar o conhecimento, à minha esposa Márcia, e aos meus filhos, Daniel e Dandara.

Não podemos fazer muito sobre a extensão de nossas vidas, mas podemos fazer muito sobre a largura e a profundidade delas."

Evan Esar

RESUMO

FERREIRA, Guilherme Neves - Bioaerossóis na indústria farmacêutica – introdução de uma barreira contra a contaminação microbiológica em salas limpas. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Este estudo teve como finalidade, testar uma barreira contra a contaminação microbiológica em placas de contato, utilizadas em monitoramento de salas limpas para fabricação de produtos farmacêuticos estéreis. Durante o ano de 2007, foram realizados testes de contato com a utilização da mencionada barreira, e os resultados foram comparados com dados dos anos de, 2004, 2005 e 2006, quando a barreira não foi utilizada. Os ambientes utilizados para os testes foram duas salas limpas de uma planta farmacêutica localizada no Rio de Janeiro. Nos mencionados ambientes é necessário o uso de uma vestimenta especial, de forma a evitar que partículas do corpo dos operadores, bactérias e fungos, migrem para a superfície externa do uniforme e coloquem em risco a esterilidade dos produtos. Sendo assim, foi proposta a colocação de uma camiseta diretamente sobre a pele do operador durante todo o ano de 2007 de forma a evitar ou reduzir a possibilidade de migração dessas partículas; e os resultados foram comparados com os anos de 2004, 2005 e 2006, quando a camiseta não foi usada. Os testes demonstraram que houve uma redução de cerca de 50% na ocorrência de placas contaminadas. Com relação ao número total de colônias formadas, a redução foi de 75% na comparação com os anos de 2004 e 2005 e de 50% com relação ao ano de 2006.

Palavras chave

Barreira

Contaminação microbiológica

ABSTRACT

FERREIRA, Guilherme Neves – Biological particles in the pharmaceutical industry – introduction of a barrier against microbiological contamination in clean rooms. Dissertation (Master degree in chemistry) – Chemical institute, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

This study had as objective to test a barrier against microbiological contamination in contact plates that are used in sterile pharmaceutical products clean rooms monitoring. During 2007 the tests were performed and compared with data from, 2004, 2005 and 2006, when the mentioned barrier was not used. The test environments were two clean rooms from a pharmaceutical plant located at Rio de Janeiro. In the mentioned environments the use of special garments is necessary for avoiding that particles from operators bodies, bacteria and most remain in contact with the room environment, adding risk to the sterilized products. So, it was proposed the use of undershirt between the garment and the operator skin for reducing the contact plate's contamination during the regular rooms monitoring. This undershirt was used during 2007 and the results were compared with the samples of 2004, 2005 and 2006 when the undershirt was not used. The results demonstrated that it was obtained a reduction of about 50% in relation to contaminated plates. In relation to the total number of colonies the reduction was 75% in comparison with 2004 and 2005, and 50% in comparison with 2006.

Keywords

Barrier

Microbiological contamination

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplos de fibras de papel, algodão e poliéster, encontradas em produtos farmacêuticos.....	21
Figura 2. Anemômetro utilizado para medir a velocidade do fluxo laminar.	39
Figura 3. Exemplo de fluxo turbulento.....	40
Figura 4. Exemplo de fluxo laminar ($0,36 - 0,54 \text{ m s}^{-1}$).....	40
Figura 5. Contador de partículas portátil.	41
Figura 6. Equipamento de amostragem por ar induzido.....	43
Figura 7. Contagem típica de unidades formadoras de colônias em uma placa de sedimentação.....	44
Figura 8. Placas RODAC	45
Figura 9. Camiseta empregada como barreira	58
Figura 10. Camiseta usada pelo operador.	58
Figura 11. Esquema dos testes preliminares e escolha dos cartões Vitek para identificação de microrganismos.	68
Figura 12 -Cartao Vitek	70
Figura 13- Sistema Vitek	71
Figura 14. <i>Penicillium</i> sp	80
Figura 15. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	82
Figura 16. <i>Bacillus</i>	82
Figura 17. <i>Bacillus megaterium</i>	83
Figura 18. Leveduras	84
Figura 19. <i>Cryptococcus laurentii</i>	84
Figura 20. <i>Candida famata</i>	85
Figura 21. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de partículas e dimensões.....	19
Tabela 2. Número máximo de partículas por m ³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (ISO 14644)	26
Tabela 3. Número máximo de partículas por m ³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (FED STD 209 D)	26
Tabela 4. Número máximo de partículas por m ³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (FED STD 209 E).....	27
Tabela 5. Número máximo de partículas por m ³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (GGMP PIC/EEC)	27
Tabela 6. Materiais utilizados em salas limpas	29
Tabela 7. Limites recomendados para contaminação microbiológica	46
Tabela 8. Limites para contagem de partículas.....	53
Tabela 9. Interpretação do teste de fermentação de carboidratos	69
Tabela 10. Número total de testes onde houve crescimento	73
Tabela 11. Número de unidades de formadoras de colônias	75
Tabela 12 Microrganismos encontrados	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Percentual de testes onde ocorreram contaminações.....	74
Gráfico 2. Percentual de colônias formadas.....	75
Gráfico 3. Incidência por tipo de microrganismo	77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 Partículas	18
1.1.1 Movimento das partículas	20
Difusão	20
Forças balísticas	20
1.1.2 Adesão das partículas	20
Adesão eletrostática	20
Aglomeração	21
Acresção	21
Fricção	21
1.2 Ambientes	22
1.2.1 Filtração	22
1.3 Sala limpa	23
1.3.1 Controle do ar insuflado	24
1.3.2 Geração interna de partículas	24
1.3.3 Controle de infiltração	25
1.3.4 Classificação das salas limpas	25
1.3.5 Materiais usados em salas limpas	26
1.3.6 Qualificação de sistemas de filtração para salas limpas	28
1.3.7 Treinamento do pessoal	30
1.4 Validação de processos de fabricação de produtos injetáveis	31
1.4.1 Simulação de processo	31
1.4.2 Estudo do desenho	32
1.4.3 Frequência e número de enchimentos	33
1.4.4 Duração dos enchimentos com meio de cultura	34
1.4.5 Tamanho dos enchimentos	34
1.4.6 Velocidade da linha de enchimento	35
1.4.7 Condições ambientais	35
1.4.8 Meio de cultura	36
1.4.9 Incubação e verificação das unidades cheias com meio de cultura	36

1.4.10	Controle do processo e ações previstas	37
1.5	Fluxos laminares	38
1.6	Contagem de partículas	41
1.7	Controle microbiológico	42
1.8	Desinfecção de salas limpas – fumigação com formaldeído	47
1.9	Operação em sala limpa	48
1.10	Legislação brasileira	53
1.11	Norma ISO 14644	55
1.12	Microbiota da pele	55
2	METODOLOGIA	57
2.1	Materiais e métodos	57
2.1.1	Resumo da proposta	57
2.1.2	Preparação e uso da camiseta	57
2.1.3	Preparação das placas de contato	59
2.1.4	Monitoramento da superfície da área abdominal	61
2.1.5	Identificação dos microrganismos	62
3	RESULTADOS	73
3.1	Número total de testes onde houve crescimento	73
3.2	Número total de unidades de formadoras de colônias	74
3.3	Microrganismos encontrados	78
3.3.1	Penicillium	80
3.3.2	Cocos	80
3.3.3	Bacilos	82
3.3.4	Leveduras	83
4	CONCLUSÃO	86
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISO	International Standardization Organization
USP	United States Pharmacopeia
RODAC	Replicate Organism Detecting And Counting
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica, ao longo dos últimos 50 anos, teve um desenvolvimento muito grande, não somente com relação às drogas descobertas para o tratamento das doenças, mas também pelo emprego de técnicas cada vez mais sofisticadas e caras, que visam a qualidade do medicamento e a segurança no seu uso. Os produtos farmacêuticos se dividem em diversas classes, de acordo com a forma de administração. Todas as formas farmacêuticas requerem boas condições de limpeza do ambiente de manufatura, que são monitorados através de controles microbiológicos e verificação de parâmetros físicos, como temperatura, umidade, número de partículas no ambiente etc. O ar é repleto de partículas poluentes, e cada vez mais, principalmente nas grandes cidades, a poluição é maior, face ao grande número de fontes de poluição fixas e móveis. De uma forma geral, embora todos estejam sujeitos a esta poluição, seus efeitos somente são sentidos na saúde, ao longo do tempo. Porém, em alguns casos específicos, particularmente na indústria farmacêutica, o ar que entra em contato com os medicamentos, deve estar livre de determinados poluentes, em especial, as partículas, sejam elas orgânicas, inorgânicas ou microbiológicas.

Limites e parâmetros utilizados são distintos, e seus critérios estão diretamente relacionados à forma farmacêutica em questão. Assim sendo, por exemplo, os limites aceitos para parâmetros microbiológicos em uma sala de fabricação de ampolas, são mais rígidos do que em uma sala de fabricação de supositórios, uma vez que a via de administração de um produto injetável (venosa ou muscular), não permite ao corpo humano o uso de suas defesas naturais e barreiras, que impedem que um microrganismo chegue à corrente sanguínea, causando danos à saúde.

Há alguns anos atrás, uma sala de enchimento de ampolas, embora limpa, e bem organizada, era composta de materiais que hoje estão sendo substituídos por outros mais apropriados, sempre com o intuito de reduzir ao máximo a geração de partículas e o crescimento de microrganismos. No passado, o ar insuflado em uma sala de enchimento não era filtrado, e nem existiam aparelhos para a contagem de partículas. Além disso, embora já houvesse o monitoramento microbiológico do ambiente, os métodos não eram tão completos como os de

hoje. Este trabalho trata do ambiente onde ocorre o enchimento de frascos ou ampolas para injeção em seres humanos. Esse ambiente possui uma série de requerimentos, a fim de se evitar a quebra de esterilidade ou inclusão de partículas no mesmo, ou seja, o risco de que uma, mais ampolas ou frascos sejam contaminados por partículas orgânicas, inorgânicas ou microbiológicas antes de seu fechamento. Para tal, o ar externo é captado, filtrado e, além disso, outras medidas para esse tipo de trabalho são necessárias, como será abordado nos capítulos posteriores.

É importante ressaltar que o operador da sala limpa torna-se o principal risco para os produtos, uma vez que a pele humana não é estéril e, por este motivo, se faz necessário o uso de macacões, sapatilhas, capuzes e luvas, de forma a cobrir totalmente a superfície do corpo. Por outro lado, esta proteção não fornece uma garantia total de que microrganismos não migrem para a parte externa da vestimenta, inclusive através de sudorese.

A tecnologia farmacêutica é uma ciência muito dinâmica, pois a cada momento novas pesquisas são realizadas e os métodos empregados hoje podem não ser os mesmos de amanhã.

Esse trabalho tem como finalidade propor uma barreira para minimizar os eventos de contaminação por placas de contato, especificamente nos testes realizados no abdômen de operadores de salas limpas. Durante os anos de 2006 e 2007, após análise dos resultados de monitoramento microbiológico das salas limpas estudadas, observou-se uma incidência maior de contaminações acima dos limites de alerta e ação, mais especificamente nos testes por contato na região abdominal dos operadores. Essas contaminações, segundo estimativas, são causadas pela passagem de microrganismos da pele (partículas viáveis) para a superfície externa do uniforme dos operadores através do suor. Neste caso, o uso de uma camiseta sob o uniforme, funciona como uma barreira para evitar esta migração e, conseqüentemente, a contaminação das placas com meio de cultura, utilizadas no monitoramento, como será apresentado.

Serão tomados como base os resultados de contagem microbiológica em abdomens de operadores de duas salas de enchimento de uma indústria farmacêutica do Rio de Janeiro. Embora neste caso, o número de colônias

formadas, seja importante no controle do processo de produtos farmacêuticos, será considerado, para medir a eficiência da barreira, apenas o número de eventos, onde houve ou não contaminação com o uso da barreira, independentemente da quantidade de colônias formadas.

Para concluir sobre a eficiência da barreira proposta, serão empregados os resultados obtidos nos controles durante os anos de 2004, 2005 e 2006 das referidas já mencionadas e, serão comparados com os resultados obtidos em 2007, quando então a barreira foi utilizada.

A dissertação esta subdividida em cinco capítulos. No capítulo um encontra-se uma revisão bibliográfica sobre o assunto, abordando conceito de partículas, ambientes, salas limpas, qualificação, validação, operação em salas limpas, treinamento de pessoal, além de legislação e normas relacionadas. O capítulo dois, trata da metodologia empregada na medição e na identificação de partículas viáveis, com e sem a utilização da barreira. O terceiro capítulo demonstra os resultados obtidos e estabelece comparações. No capítulo quatro é apresentada a conclusão, seguido do capítulo cinco com as referências bibliográficas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Partículas

Partículas podem ser oriundas de diversas fontes, e podem ser classificadas basicamente como: partículas orgânicas e inorgânicas. As partículas orgânicas são derivadas de seres vivos, e podem ser viáveis ou não.

As partículas viáveis têm a capacidade de se desenvolver e gerar novas partículas, como microrganismos, bactérias, vírus e fungos. Os seres humanos são fontes importantes de partículas viáveis. Já as não viáveis, embora sejam oriundas de seres vivos, não se proliferam, como por exemplo, uma célula de pele morta. As partículas orgânicas se caracterizam também por possuírem carbono. As partículas inorgânicas são inertes e oriundas do atrito entre materiais. O atrito de pneus com o solo gera partículas, assim como a desintegração de plásticos sob ação de luz ultravioleta (KOCHEVAR, 2006).

No contexto de métodos de fabricação atuais as partículas menores que existem são tão pequenas que não podem ser consideradas como contaminação. Essas menores partículas são muitas vezes menores que um átomo, e são chamadas partículas subatômicas, como os leptons, muons, quarks, neutrinos etc. A outra grande família de partículas é a dos átomos, posteriormente por ordem de tamanho vêm as moléculas ou grupo de átomos. Esses também são muito pequenos para ser considerados como micro contaminação industrial.

Partículas podem ser feitas de qualquer substância e, como já visto, podem ser orgânicas ou inorgânicas em suas origens. Metais, plásticos, fibras, animais, sal do mar, fumaça e poeira são exemplos de fontes de partículas. Virtualmente, qualquer coisa pode gerar partículas sob determinadas circunstâncias. Em uma sala limpa, o maior gerador de partículas é o próprio ser humano, através da emissão de células da pele, respiração, espirro etc.

Existe uma grande variação de tamanho de partículas. Um fio de cabelo humano, por exemplo, tem cerca de 50 a 150 μm de diâmetro. Na Tabela 1 são mostrados alguns exemplos de partículas e suas respectivas dimensões.

Tabela 1. Exemplos de partículas e dimensões.

Partícula	Tamanho aproximado
Poeira metalúrgica	0,01 a 100 μm
Poeira atmosférica	0,01 a 25 μm
Vírus influenza	0,07 μm
Pólen	7 a 100 μm
Partículas de espirro	10 a 300 μm

Estudos demonstraram que o ar poluído de uma cidade possui dois tipos distintos de partículas:

- Partículas maiores que 2,5 μm são tipicamente originadas de solos, jardins, etc. Dosagens químicas detectaram elementos como silício, potássio, magnésio, ferro etc. estão presentes e costumam ter origem natural.
- Partículas menores que 2,5 μm são tipicamente originadas de emissões industriais, combustão e tráfego de veículos. Essas partículas, normalmente contêm carbono, enxofre etc. São consideradas antropogênicas e provocam grandes problemas de saúde por atingirem as partes inferiores do trato respiratório (NEW WAYS CONSULTING LIMITED, 2000).

As partículas exibem certa tendência de comportamento. Elas se movem no ar e em outros fluidos através de forças de difusão e forças balísticas e se acumulam nas superfícies através da gravidade e de adesão eletrostática.

Se um corante vermelho é colocado em água limpa, em poucos instantes a água se torna uniformemente colorida. A este fenômeno dá-se o nome de difusão e ocorre tanto em gases quanto em líquidos. Em geral ocorre na tendência das espécies equilibrarem o potencial químico, onde as moléculas de uma região de maior concentração movem-se para uma de menor concentração. Outros movimentos são os fenômenos de corrente, variação térmica ou movimento Browniano.

1.1.1 Movimento das partículas

Difusão

Correntes: são os movimentos laminares e turbulentos de um fluido. Correntes são o resultado de diferentes pressões, com o fluido sempre se movendo de uma área de maior pressão para uma área de menor pressão.

Variação térmica: a diferença de temperatura em um fluido contribui para as correntes, particularmente para correntes verticais, pois o aquecimento de um fluido favorece o aumento do movimento Browniano. Isso faz com que as moléculas fiquem com maior energia e, conseqüentemente, colidam com maior freqüência. Esta é a razão pela qual, ar aquecido é menos denso que ar frio, e tende a subir.

Movimento Browniano: o ar é repleto de partículas, variando de poeira visível até moléculas gasosas não visíveis, que estão constantemente colidindo entre si.

Forças balísticas

Partículas podem ser projetadas de um dispositivo ou processo, causando um movimento contrário ao fluxo de ar. Esse é o motivo pelo qual, partículas são freqüentemente encontradas em uma verdadeira distribuição aleatória.

1.1.2 Adesão das partículas

Existem diversas formas de uma partícula perder seu estado livre de difusão. Essas forças de adesão primárias são: adesão eletrostática, aglomeração e fricção.

Adesão eletrostática

Partículas podem carregar eletricidade estática da mesma forma que um balão de borracha quando friccionado contra o couro cabeludo. Isso causa a atração e aderência de partículas às superfícies de carga oposta.

Aglomeração

Em líquidos, partículas tendem a se aglomerar e aderir à bolhas de gás.

Acresção

Partículas podem se aderir entre si. Isso pode ser o resultado de adesão eletrostática ou outra força de adesão. Em certas condições é comum para duas partículas se aderirem formando uma partícula maior.

Fricção

Uma partícula pode ser capturada em uma superfície rugosa onde as forças de movimento não são suficientes para deslocá-la. Em certas condições isso é comum para duas partículas. Esse mecanismo em conjunto com a adesão eletrostática é a base da maioria dos tipos de filtração.

A Figura 1 mostra um exemplo de contaminação por partículas, vista por microscopia, em produto farmacêutico.



Figura 1. Exemplos de fibras de papel, algodão e poliéster, encontradas em produtos farmacêuticos. (SHEARER, 2004).

1.2 Ambientes

Muitas das práticas tecnológicas atuais necessitam de ambientes limpos, especificamente elas requerem ausência de contaminação por partículas.

Um exemplo mais concreto, é o ambiente para produção de semicondutores, mais comumente conhecidos como *microchips*. Um *microchip* é um pedaço de silicone onde minúsculos pedaços de fio são colocados, formando transistores e outros componentes. Isso permite ao fabricante, criar um minúsculo circuito eletrônico. Alguns fios são tão próximos ($0,3\ \mu\text{m}$) que uma partícula pode provocar um curto circuito ao se depositar entre eles. Por essa razão, os fabricantes de *microchips* necessitam retirar do ambiente de produção, partículas maiores ou iguais a $0,3\ \mu\text{m}$. Partículas menores não são grandes o suficiente para provocar curtos circuitos.

Outro exemplo pode ser observado na indústria farmacêutica: uma droga injetável deve ser livre de partículas que podem causar a obstrução de um vaso sanguíneo, provocando isquemia ou necrose. A indústria farmacêutica a exemplo da indústria de *microchips* tem de controlar o ambiente de produção para eliminar a contaminação por partículas. Existem três formas de se controlar a contaminação por partículas:

- Eliminando partículas existentes no ambiente fabril;
- Evitando ou restringindo a importação de novas partículas no ambiente de processo;
- Evitando a geração de novas partículas no processo produtivo.

1.2.1 Filtração

Partículas são eliminadas por filtração. Na filtração, o meio contendo as partículas é passado através de um filtro com orifícios grandes o suficiente para permitir a passagem das moléculas do fluido, mas pequeno o bastante para impedir a passagem das partículas. Um filtro acumula partículas durante sua vida útil sendo substituído antes de sua completa saturação, embora alguns meios filtrantes possam ser limpos e reutilizados.

Existem dois passos para a filtração: direcionar as partículas para o filtro e capturá-las no mesmo. Direcionar as partículas para o filtro é a parte mais difícil da filtração, uma vez que em um ambiente de fabricação existem inúmeras fontes de partículas. A forma ótima de reduzir a geração de partículas é através do trabalho em regime de fluxo laminar, entretanto é muito difícil manter essa condição durante os processos. O meio filtrante tem sido alvo de inúmeros desenvolvimentos ao longo dos últimos anos. Em geral, são feitos de fibras sintéticas, plásticos porosos ou cerâmicos. Existem dois padrões de filtração atualmente em uso:

- Filtração HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), é o padrão para ambientes de fabricação ultra-limpos ou ultra-puros. Os filtros HEPA tipicamente removem 99,99% das partículas iguais ou maiores que um determinado tamanho, usualmente 0,3 μm . Filtração HEPA é geralmente parte integrante de sistemas de ar condicionado com aquecimento e ventilação. Esse sistema não remove vírus, que podem ser menores do que 2 nm. Embora seja razoável se esperar que vírus estejam presentes aderidos a outras partículas maiores. Eles podem também ser encontrados em seu estado fundamental, como uma única partícula. A maioria dos vírus não sobrevive em ausência de umidade, mas estudos demonstraram que o tipo *rhinovirus*, pode sobreviver de 2 a 4 horas em ambientes de baixa umidade (JAISINGHANI, 1998).
- Filtração ULPA (*Ultra Low Penetration Air*), remove 99,9995% de partículas maiores ou iguais a 0,12 μm (ENVIRCO).

1.3 Sala limpa

O número de partículas em um ambiente de fabricação de medicamentos e correlatos deve ser controlado e limitado. Tal ambiente é planejado de forma a minimizar a entrada, a geração e a manutenção de partículas em seu interior. Existem outros parâmetros, também importantes nesse tipo de produção como: temperatura, umidade, filtração do ar insuflado, velocidade do ar e pressurização da sala. Esse ambiente é construído e utilizado de forma a

minimizar a introdução, geração e retenção de partículas. Um programa formal deve ser estabelecido e mantido para avaliar esses fatores e seus efeitos sobre a qualidade microbiológica do processo e do produto (BOOTH, 2003).

Os fundamentos de um projeto de uma sala limpa estão no controle da concentração de partículas. O material particulado encontrado em salas limpas é proveniente de 3 fontes: sistema de insuflação de ar, geração de partículas internamente na sala, ou proveniente de áreas adjacentes à sala. Para controlar a quantidade de partículas em uma sala limpa, essas três fontes têm de ser controladas.

1.3.1 Controle do ar insuflado

Partículas no ar externo são facilmente controladas pelo uso de filtros HEPA. A maioria dos filtros HEPA tem uma eficiência mínima de 99,97% com relação a partículas de 0,3 μm . Em outras palavras, somente menos que 0,03% de todas as partículas de 0,3 μm ou maiores podem atravessar esses filtros. Então, se o ar de retorno contém 1000 partículas por ft^3 (353.000 por m^3), sua concentração seria reduzida para menos de 3 partículas por ft^3 (106 partículas por m^3), depois de passar pelo filtro. Portanto, o ar fornecido para a sala limpa pode ser considerado “quase” livre de partículas.

1.3.2 Geração interna de partículas

A geração interna de partículas é sempre o foco do projeto de qualquer sala limpa. A geração interna é oriunda de elementos de construção da sala como operadores, teto, paredes, piso, mobiliário, teto etc., da máquina de enchimento de ampolas ou frascos e principalmente dos operadores. A geração de partículas por elementos de construção pode ser minimizada pelo uso de materiais rígidos, não porosos, tais como polivinil, tinta epóxi e vidro. A geração interna pelos operadores pode ser reduzida através do uso de roupa adequada, para evitar que partículas do corpo do operador, sejam emitidas para o ambiente da sala.

1.3.3 Controle de infiltração

Partículas de áreas adjacentes são de fácil controle, se a área adjacente é menos limpa que a sala limpa. Infiltrações de partículas na sala limpa podem ser minimizadas pelo controle da direção do fluxo de ar, tal que o fluxo de ar seja sempre da sala limpa para as áreas adjacentes. Isso é facilmente alcançado fazendo-se com que a insuflação de sala seja maior que a exaustão da sala, pressurizando levemente a mesma.

Como já mencionado, os operadores são a principal fonte de geração de partículas. Já é bem conhecido que células mortas são liberadas do corpo humano a cada minuto, o que contribui para a liberação de milhões de partículas na sala limpa. Um operador de sala limpa, devidamente uniformizado, poderia gerar aproximadamente 10.000 partículas de 0,5 μm ou maiores por segundo por ft^3 (353.000 partículas por m^3) de volume de ar. Considerando-se uma sala de 20 ft X 20 ft X 9 f (6 m X 6 m X 2,75 m), com quatro operadores, a taxa de geração de partículas pelos operadores seria de 670 por minuto por ft^3 (23.660 por minuto por m^3) (AKAMINE, 2007).

Entretanto, mesmo que uma alta taxa de troca de ar esteja presente, uma completa dispersão de partículas é altamente indesejável. As áreas imediatamente ao redor dos operadores terão uma concentração muito maior de partículas do que aquelas mais distantes. Com isso em mente, uma estimativa razoável para geração de partículas por operadores, seria de aproximadamente 5.000 partículas por minuto por ft^3 (177.000 partículas por minuto por m^3), em uma sala limpa típica (ZHANG, 2004).

1.3.4 Classificação das salas limpas

A norma ISO 14644-1 descreve as 9 classes ISO para salas limpas. Para cada classe ISO, existem limites máximos de partículas por m^3 de ar, de acordo com o tamanho. Os limites para diferentes normas se encontram nas Tabelas 2 a 5 e os limites referem-se à condição de repouso da sala, ou seja, a contagem de partículas é efetuada, sem que a sala esteja em operação.

1.3.5 Materiais usados em salas limpas

Os materiais a serem utilizados na construção de uma sala limpa, devem levar em conta a classe de limpeza da sala limpa, efeitos de abrasão ou impacto, métodos de limpeza e ataques químicos e biológicos.

Tabela 2. Número máximo de partículas por m³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (ISO 14644)

Classe	≥ 0,1 µm	≥0,2 µm	≥0,3 µm	≥0,5 µm	≥1 µm	≥5 µm
1	10	2	0	0	0	0
2	100	24	10	4	0	0
3	1.000	237	102	35	8	0
4	10.000	2.370	1.020	352	83	0
5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

Tabela 3. Número máximo de partículas por m³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (FED STD 209 D)

Tamanho	≥ 0,1 µm	≥ 0,2 µm	≥ 0,3 µm	≥ 0,5 µm	≥ 1 µm	≥ 5 µm
1	1.236	265	106	35	-	0
10	12.359	2.648	1.059	353	-	0
100	-	26.483	10.593	3.531	-	0
1.000	-	-	-	35.310	-	247
10.000	-	-	-	353.100	-	2.472
100.000	-	-	-	3.531.000	-	24.717

Tabela 4. Número máximo de partículas por m³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (FED STD 209 E)

Tamanho	≥ 0,1 µm	≥0,2 µm	≥0,3 µm	≥0,5 µm	≥1 µm	≥5 µm
M1	350	75,7	30,9	10	-	0
M1,5	1.240	265	106	35,3	-	0
M2	3.500	757	309	100	-	0
M2,5	12.400	2.650	1.060	353	-	0
M3	35.000	7.570	3.090	1.000	-	0
M3,5	-	26.500	10.600	3.530	-	0
M4	-	75.700	30.900	10.000	-	0
M4,5	-	-	-	35.530	-	247
M5	-	-	-	100.000	-	618
M5,5	-	-	-	353.000	-	2.470
M6	-	-	-	1.000.000	-	6.180
M6,5	-	-	-	3.530.000	-	24.700
M7	-	-	-	10.000.000	-	61.800

Tabela 5. Número máximo de partículas por m³ de ar para diferentes tamanhos de partículas (GGMP PIC/EEC)

Tamanho	≥ 0,1 µm	≥0,2 µm	≥0,3 µm	≥0,5 µm	≥1 µm	≥5 µm
A	-	-	-	3.500	-	0
B	-	-	-	3.500	-	0
C	-	-	-	350.000	-	2.000
D	-	-	-	3.500.000	-	20.000

(NORDIC R3 ASSOCIATION , 2000)

Os materiais que estarão em contato direto com o ar insuflado devem ser considerados em especial, incluindo dutos e difusores. O acabamento interno de uma sala limpa deve conter o mínimo de reentrâncias e cantos, devendo ser de fácil limpeza. As paredes, teto e junções de uma sala limpa devem ser selados assim como todo e qualquer equipamento que for instalado através de paredes e tetos tais como difusores, luminárias, tomadas elétricas, dispositivos contra

incêndio, janelas e portas. A Tabela 6, retirada da ISO 14644, exemplifica alguns materiais e suas propriedades para construção de salas limpas.

1.3.6 Qualificação de sistemas de filtração para salas limpas

O processo de qualificação de um sistema de tratamento de ar para salas limpas deve ser lógico, sistemático e deve ser iniciado na fase de projeto. Dependendo da função e operação do sistema, somente as qualificações de instalação e de operação podem ser necessárias, pois o correto funcionamento do sistema pode ser considerado indicador suficiente de seu desempenho. Porém, de uma forma, geral os sistema mais importantes de uma instalação requerem também qualificação de desempenho.

Qualificação de desenho: deve fornecer documentos que evidenciem que as especificações de desenho do projeto foram seguidas.

Qualificação de instalação: deve fornecer documentos que comprovem que a instalação foi completada e é satisfatória. As especificações dos materiais utilizados, desenhos, manuais, lista de peças sobressalentes e detalhes do fornecedor devem ser verificados durante essa fase. Os instrumentos de controle e medição devem ser calibrados.

Qualificação de operação: deve fornecer documentos que evidenciem que o sistema e todos os seus componentes funcionam de acordo com as especificações operacionais. Os testes devem ser determinados para demonstrar uma operação satisfatória, mesmo acima dos limites de operação normais, incluindo os casos críticos, ou seja, situações limites a que o sistema possa ser submetido durante sua vida útil. Controles operacionais, alarmes, interruptores, displays e outros componentes operacionais devem ser desafiados e testados. Medições feitas com tratamento estatístico devem ser bem fundamentadas.

Qualificação de desempenho: deve fornecer documentos que evidenciem que o sistema e todos os seus componentes podem operar consistentemente de acordo com as especificações, em operações de rotina (WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS, 2006).

Tabela 6. Materiais utilizados em salas limpas

Materiais	Controle eletrostático	Resistência abrasão	Resistência ao impacto	Permeabilidade
Paredes				
Alumínio anodizado	Pobre	Bom	Não	Baixo
Metais cobertos	Pobre a bom	Bom	Médio a baixo	Baixo a alto
Cortinas flexíveis	Pobre		Bom	Médio a alto
Vidro	Pobre	Bom	Não	Baixo
Vidro com filme condutor	Bom	Bom	Não	Baixo
Laminados plásticos	Pobre a bom	Bom	Pobre	Médio a alto
Painéis resinados	Pobre a bom	Bom	Pobre	Médio a alto
Aço inox	Bom	Bom	Bom	Muito baixo
Plástico transparente com filme condutor	Bom	Baixo	Pobre	Baixo a médio
Plástico transparente	Pobre	Baixo	Pobre	Médio a baixo
Tetos				
Alumínio anodizado	Pobre	Bom	Não	Baixo
Metais cobertos	Pobre a bom	Bom	Médio a baixo	Baixo a alto
Laminados plásticos	Pobre a bom	Bom	Baixo	Médio a alto
Aço inox	Bom	Bom	Bom	Muito baixo
Plástico transparente com filme condutor	Bom	Baixo	Pobre	Baixo a médio
Plástico transparente	Pobre	Baixo	Pobre	Baixo a médio
Piso				
Alumínio anodizado	Pobre	Bom	Baixo	Baixo
Metais cobertos	Pobre a bom	Bom	Médio a baixo	Baixo a alto
Lajota polida	Pobre	Bom	Bom	Baixo
Vidro	Pobre	Bom	Não	Baixo
Vidro com filme condutor	Bom	Bom	Não	Baixo
Epóxi	Pobre a bom	Pobre	Pobre	Baixo a alto
Laminados plásticos	Pobre a bom	Bom	Pobre	Médio a alto
Painéis resinados	Pobre a bom	Bom	Pobre	Médio a alto
Aço Inox	Bom	Bom	Bom	Muito baixo
Plástico transparente com filme condutor	Bom	Baixo	Pobre	Baixo a médio
Plástico transparente	Pobre	Baixo	Pobre	Baixo a médio

(AIDOS,2006)

1.3.7 Treinamento do pessoal

Um processo asséptico bem desenhado minimiza a necessidade de intervenção do operador. O risco para a esterilidade do produto final aumenta com o aumento das atividades do operador da linha de enchimento. Para assegurar a esterilidade do produto, os operadores envolvidos em manipulações assépticas devem seguir os princípios básicos de técnicas assépticas durante todo o tempo.

Treinamento apropriado deve ser conduzido antes que uma pessoa seja admitida na área de processamento asséptico. Esse treinamento deve incluir técnicas de assepsia, comportamento em sala limpa, microbiologia, higiene, uso de vestimentas, perigos a pacientes expostos a produtos não estéreis e procedimentos específicos de operação da área. Após o treinamento inicial, o pessoal envolvido deve ser regularmente treinado, através de um programa de reciclagem. O pessoal de supervisão deve periodicamente avaliar cada operador com relação aos procedimentos durante as operações de rotina. Paralelamente à unidade de Controle de Qualidade deve verificar a aderência das operações aos procedimentos estabelecidos.

Algumas das seguintes técnicas auxiliam na manutenção da esterilidade de objetos e superfícies dentro da sala limpa:

- Tocar materiais esterilizados somente com instrumentos esterilizados,
- Movimentar-se vagarosamente e sem movimentos bruscos,
- Manter o corpo fora do alcance do fluxo laminar que protege a área de enchimento ou onde contenham itens que entrarão em contato com o produto,
- As manipulações necessárias devem ser feitas lateralmente aos frascos e ampolas e nunca sobre os mesmos,
- Manter sempre o uso correto da vestimenta.

As pessoas de operação podem afetar significativamente a qualidade do ambiente onde os produtos estéreis são processados. Um programa de monitoramento vigilante deve ser estabelecido. O monitoramento deve prever amostragem de superfícies das luvas dos operadores diariamente. Essa amostragem deve ser acompanhada também para diferentes áreas da vestimenta como antebraço, abdômen etc. Assepsia é fundamental para operações

assépticas. Quando os resultados mostram tendências de aumento de contaminação, uma investigação se faz necessária, incluindo, se possível, medidas para reduzir o risco.

1.4 Validação de processos de fabricação de produtos injetáveis

A fabricação de produtos injetáveis por enchimento asséptico, ou por esterilização final, requer que o processo produtivo esteja validado, ou seja, que o mesmo cumpra com determinados requisitos e normas que serão apresentados adiante.

1.4.1 Simulação de processo

Para assegurar a esterilidade dos produtos, os processos de esterilização final, enchimento asséptico e as operações de fechamento das ampolas ou frascos-ampola, devem ser adequadamente validadas. O objetivo dos mais rigorosos processos de fabricação de produtos estéreis pode ser destruído, caso haja falha nos processos de esterilização do produto, das ampolas, dos frascos ou durante o fechamento dos mesmos.

A validação de um processo de operação asséptico deve incluir o uso de um meio de cultura para microrganismos em substituição ao produto, seguindo as mesmas condições de fabricação. Nas simulações normais o meio nutriente deve ter contato com todos os acessórios e sistemas com os quais o produto tem contato, incluindo também o ambiente, de forma a garantir a mesma exposição a qual, é submetido o produto. As ampolas ou frascos cheios com meio de cultura são então incubados para detecção de contaminação microbiológica. Os resultados devem ser interpretados para determinar o risco potencial de uma unidade do medicamento ser contaminada durante as operações reais. O monitoramento ambiental durante a simulação do processo também fornece valiosa informação sobre a avaliação do mesmo.

1.4.2 Estudo do desenho

Um programa recomendado de enchimento com meio de cultura incorpora os fatores de risco de contaminação que ocorrem em uma linha de produção. Estudos de enchimentos com meio de cultura devem simular operações de fabricação por enchimento asséptico tão próximo quanto possível da realidade, incorporando o conceito de caso crítico, ou seja, a escolha de situações específicas de cada processo, nas quais o risco de contaminação é maximizado. O programa de enchimento com meio de cultura deve considerar os seguintes tópicos:

- Fatores associados com o tempo máximo permitido de período de enchimento ao longo da fabricação de um lote de produto,
- Número e tipo de intervenções normais, intervenções atípicas, eventos inesperados (por exemplo, manutenção na linha durante o processo), paradas, ajuste de equipamentos ou transferências,
- Liofilização, quando aplicável,
- Montagem asséptica do equipamento,
- Número de operadores e suas atividades,
- Quantidade de material que é introduzido na sala limpa,
- Trocas de turnos, paradas e trocas de uniforme,
- Número e tipo de conexões e desconexões assépticas,
- Amostragens assépticas,
- Velocidade da linha de enchimento,
- Verificação manual de pesos líquido em ampolas e frascos,
- Cansaço do operador,
- Sistema de fechamento de ampolas e frascos.

Um registro do processo de enchimento, com os documentos de produção e atividades simuladas, deve ser preparado para cada enchimento com meio de cultura. O mesmo rigor deve ser observado quando comparado a um processo de fabricação rotineiro. Enchimentos com meio de cultura não devem ser usados para justificar práticas inaceitáveis.

1.4.3 Freqüência e número de enchimentos

Quando uma linha de enchimento é inicialmente qualificada, vários enchimentos podem ser efetuados repetidamente, um número de vezes suficiente para garantir que os resultados são consistentes. Este conceito é importante porque um simples enchimento pode ser insuficiente para se chegar à alguma conclusão, ao passo que múltiplos enchimentos com resultados divergentes indicam que o processo está fora de controle. Pelo menos 3 enchimentos consecutivos devem ser realizados na fase inicial de qualificação da linha de produção. Subseqüentemente, qualificações semestrais rotineiras para cada linha de produção, para avaliar o estado de controle dos processos de enchimento asséptico. Atividades e intervenções representativas para cada turno de trabalho, e trocas de turno devem ser incorporadas nas mencionadas verificações semestrais. Por exemplo, a avaliação de um turno de trabalho deve representar todas as ocorrências relacionadas àquele período com suas características. Todo o pessoal que entra geralmente dentro da sala limpa, incluindo operadores e pessoal de manutenção deve participar de um enchimento com meio de cultura ao menos uma vez por ano. A participação deve ser consistente com a natureza da atividade de cada pessoa durante a rotina de produção. Toda a mudança de um produto ou linha deve ser avaliada através de um sistema registrado de controle de mudanças. Quaisquer mudanças ou eventos que possam potencialmente afetar o processo asséptico de enchimento deve ser testado através de enchimentos adicionais com meio de cultura. Por exemplo, alterações em equipamentos e utilidades, alterações na configuração da linha de enchimento, mudança do pessoal de operação, anomalias nos resultados de monitoramento de ambiente, ou contaminação nos produtos, podem ser motivos para revalidação do sistema.

Informações fornecidas após o enchimento com meio de cultura que indicam que o processo pode estar fora de controle devem gerar investigação bem conduzida, para determinar a origem da contaminação e a causa do problema. Uma vez que as ações corretivas são tomadas, novos três enchimentos com meio de cultura devem ser efetuados para confirmar que as deficiências foram corrigidas.

1.4.4 Duração dos enchimentos com meio de cultura

A duração das operações de processamento asséptico é o principal elemento para determinar o tamanho do lote de enchimento com meio de cultura. Embora o mais preciso modelo simulado seja o enchimento com o tamanho de lote igual ao do produto, ou pelo menos do produto com maior número de ampolas, pois desta forma pode se simular exatamente o que ocorre na realidade; são aceitos outros modelos, desde que se justifique. Em qualquer enchimento simulado o tempo de duração deve cobrir as piores condições de operação bem como todas as manipulações que são realizadas em um processo normal de produção. Com relação a este último ponto, intervenções que comumente ocorrem devem ser rotineiramente simuladas, enquanto que aquelas que raramente ocorrem, podem ser periodicamente simuladas.

Enquanto linhas de produção convencionais são altamente automatizadas, e geralmente operam com altas velocidades, e são desenhadas para limitar ao máximo as intervenções do operador; existem alguns processos que necessitam de um número grande de intervenções pelo operador. Quando processos assépticos empregam enchimento ou fechamento manual ou extensas manipulações manuais, o tempo de duração da simulação do processo não deve ser menor do que o tempo real de processo, de forma a simular os riscos de contaminação inerentes aos operadores.

1.4.5 Tamanho dos enchimentos

O tamanho dos enchimentos simulados deve ser adequado de forma a imitar as condições de lotes comerciais e assim medir o risco potencial de contaminação de lotes comerciais. O número de unidades (ampolas ou frascos) cheias durante a simulação do processo deve ser baseado no risco de contaminação do mesmo, e deve ser suficiente para que todas as atividades inerentes ao processo original sejam testadas. Em geral um número aceitável para tamanho dos enchimentos é de 5.000 a 10.000 unidades. Para operações com tamanhos de produção abaixo de 5.000 unidades, o número de unidades

testadas no enchimento simulado deve ser igual ao do maior lote produzido na linha de produção em questão.

Quando a possibilidade de contaminação é muito direcionada para o desenho do processo (exemplo: muitas operações manuais), um número grande de unidades, geralmente igual ou muito próximo do tamanho de um lote comercial deve ser experimentado no enchimento simulado. Em contrapartida, um processo conduzido em um isolador pode ter um baixo risco de contaminação, devido à pouca intervenção humana direta no processo. Esses fatos devem ser cuidadosamente considerados quando do desenho da simulação para adequá-la às condições de cada caso.

1.4.6 Velocidade da linha de enchimento

A programação de enchimento com meio de cultura deve ser efetuada para todos os formatos e volumes de enchimento dos produtos fabricados em determinada linha. Cada enchimento com meio de cultura deve poder avaliar o caso crítico de velocidade de linha e a velocidade escolhida para cada enchimento deve ser justificada. Por exemplo, o emprego de uma alta velocidade é geralmente mais apropriado para avaliação de processos de fabricação caracterizados por intervenções freqüentes ou um significativo grau de intervenções manuais. Já o uso de uma velocidade baixa é geralmente apropriado para avaliação de processos caracterizados por exposição prolongada do produto e dos recipientes de tampas ou rolhas na área asséptica.

1.4.7 Condições ambientais

Enchimento com meio de cultura deve ser adequadamente representativo das condições sobre as quais as operações de fabricação são conduzidas. Uma análise não precisa pode resultar na exposição do enchimento com meio de cultura a uma condição extraordinária, com relação à contagem de partículas e à qualidade microbiológica, ou ainda no que diz respeito à fabricação do meio de cultura, sob condições muito mais rígidas do que aquelas utilizadas na operação normal. Para suportar a validade do trabalho, é necessário que o enchimento com meio de cultura, seja conduzido em ambiente similar ao ambiente do dia-a-dia.

1.4.8 Meio de cultura

Em geral um meio de cultura microbiológica como, por exemplo, a caseína de soja deve ser empregado. O uso de meios de crescimento anaeróbico somente deve ser usado em circunstâncias especiais. O meio selecionado deve demonstrar promover o crescimento de microrganismos oriundos do ambiente, das pessoas e resultados positivos do teste de esterilidade. Unidades de controle positivo devem ser inoculadas com teste de desafio contendo menos de 100 unidades formadoras de colônias e incubadas. O processo produtivo deve ser precisamente simulado usando-se meio de cultura e condições que possibilitem a detecção de qualquer contaminação microbiológica. Cada unidade deve ser cheia com tipo e quantidade apropriados de meio de crescimento microbiológico de forma que toda a superfície da tampa do frasco quando for o caso possa ser umedecida com o meio, quando o mesmo for invertido, consequentemente possibilitando a visualização da contaminação.

1.4.9 Incubação e verificação das unidades cheias com meio de cultura

O meio de cultura deve ser incubado em condições adequadas para detectar organismos que podem ter dificuldades de crescimento. As condições de incubação devem ser estabelecidas de acordo com as seguintes regras gerais:

- A temperatura de incubação deve ser apropriada para recuperação da carga microbiana e não pode estar em nenhum momento fora da faixa 20-35°C, de forma a possibilitar o crescimento de qualquer microrganismo, uma vez que os mesmos possuem diferentes temperaturas ideais de crescimento. A temperatura de incubação deve ser mantida em $\pm 2,5^{\circ}\text{C}$ da temperatura estabelecida.
- O tempo de incubação não deve ser menor do que 14 dias, uma vez que de acordo com o microrganismo e adaptação do mesmo ao meio, é possível que haja início de crescimento, em todo este intervalo de tempo. Se duas temperaturas forem usadas para a incubação das amostras com meio de cultura, as mesmas devem ser incubadas no mínimo 7 dias em cada temperatura.

Cada unidade cheia com meio de cultura deve ser examinada com relação à contaminação por pessoas treinadas para este tipo de tarefa e experiente em técnicas microbiológicas. Os frascos ou ampolas utilizados no enchimento com meio devem ser transparentes de modo a possibilitar uma boa visualização mesmo com uma contaminação leve.

Unidades encontradas com defeitos não relativos à integridade das mesmas devem ser incubadas. Após a incubação qualquer unidade encontrada danificada deve ser incluída no relatório final do enchimento com meio de cultura.

Procedimentos escritos relacionados à intervenções asséticas devem ser claros e específicos, quanto ao tipo de intervenção e quantidade de unidades descartadas. As condições previstas nesses procedimentos devem ser seguidas exatamente na produção como realizado no enchimento com meio de cultura. Um critério apropriado deve ser estabelecido para rendimento do enchimento. A documentação de registro de reconciliação do enchimento com meio de cultura deve ser incluído com as observações de todas as unidades rejeitadas e seus motivos.

1.4.10 Controle do processo e ações previstas

O processo de simulação deve ser observado de forma a se verificar se há ao longo do mesmo algum fato que possa interferir nos resultados. Neste caso é importante filmar todo o processo para identificar hábitos e atitudes do pessoal envolvido, com a finalidade de prevenir futuros problemas.

Qualquer contaminação ocorrida deve ser integralmente investigada e considerada. Os microrganismos devem ser investigados até o nível de espécie. No caso de uma falha no enchimento com meio de cultura, uma investigação deve ser conduzida, pesquisando todas as possíveis causas de contaminação. Os efeitos em medicamentos já vendidos, e fabricados desde o último enchimento realizado com bons resultados, devem ser avaliados.

Quando ocorre contaminação em um enchimento com meio de cultura, tal fato pode ser um indicativo de um problema potencial de garantia de esterilidade. O número de unidades contaminadas não deve aumentar em proporção direta ao número de unidades cheias. Os resultados devem ser confiáveis e reproduzíveis

e devem demonstrar que unidades produzidas por enchimento asséptico são estéreis. Modernas instalações têm demonstrado que a possibilidade de encontrar contaminação em enchimentos com meio de cultura em sido muito próxima de zero. Os seguintes critérios são utilizados para este tipo de trabalho:

- Quando se enche menos do que 5.000 unidades, não pode haver nenhuma contaminação,
- Quando se enche entre 5.000 e 10.000 unidades, 1 contaminação deve resultar em investigação, incluindo a consideração de se repetir o enchimento. 2 contaminações ou mais são consideradas causas para revalidação da linha, e uma investigação deve ser realizada,
- Quando se enche mais de 10.000 unidades, 1 contaminação deve resultar em investigação e 2 contaminações ou mais são consideradas causas de revalidação. Para qualquer tamanho de enchimento, incidentes intermitentes de contaminação microbiológica em corridas com meio de cultura podem ser um indicativo de um nível baixo, porém constante de problemas de contaminação e deve ser investigado. Fatos recorrentes de incidentes de contaminação em uma determinada linha de enchimento pode ser um sinal de tendência a um problema que deve ser identificado e corrigido; e a linha deve sofrer revalidação.

Como em todo processo de validação, uma corrida com meio de cultura somente pode ser abortada ou desconsiderada sob condições ou fatos que levariam também à destruição por parte da empresa, de um lote industrial. É necessário, no entanto, ter documentação que comprove tal medida (GUIDANCE FOR INDUSTRY,2004).

1.5 Fluxos laminares

Os sistemas de fluxos laminares são utilizados para evitar a turbulência no ambiente de enchimento de frascos ou ampolas, reduzindo o risco de contaminação dos mesmos. As máquinas de enchimento são posicionadas dentro da sala limpa, de forma que o fluxo laminar mantenha um ambiente de proteção, onde o ar flui em uma única direção.. Para obtenção de um fluxo laminar é necessário que a velocidade do ar esteja na faixa de 0,36 a 0,54 m s⁻¹. Na Figura

2, pode-se observar um exemplo de anemômetro, que é um instrumento de medição da velocidade do ar, usado para ajustar o fluxo de ar em salas limpas, e consequentemente manter a laminaridade do mesmo. As Figuras 3 e 4 ilustram a diferença entre sistemas com insuflação de ar sem e com regime de fluxo laminar.

A condição de fluxo laminar é mandatória para salas limpas. Turbulências e gradientes de velocidade são capazes de coletar e manter partículas em suspensão. Para atender integralmente as condições de laminaridade de fluxo, uma sala limpa tem de ser desenhada aerodinamicamente (KRUPKA, 2003).



Figura 2. Anemômetro utilizado para medir a velocidade do fluxo laminar.

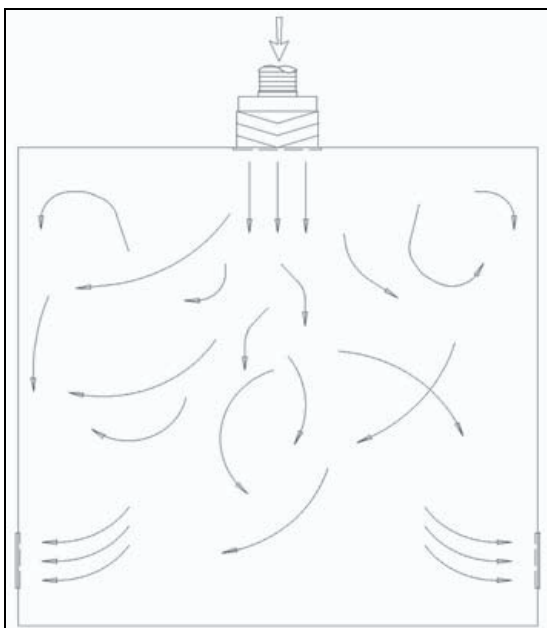


Figura 3. Exemplo de fluxo turbulento.

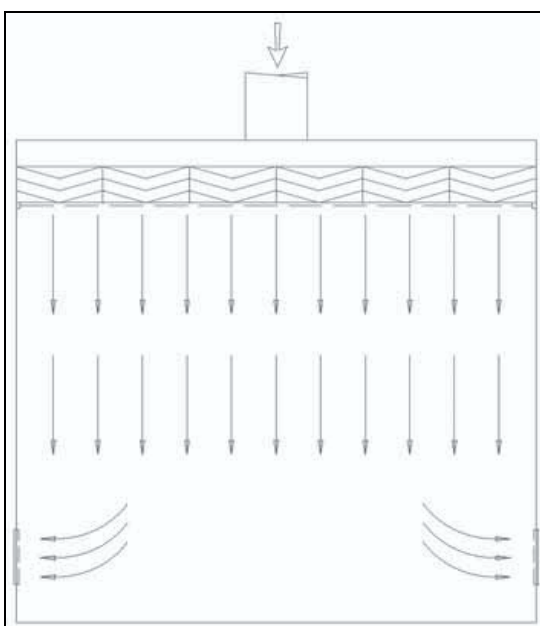


Figura 4. Exemplo de fluxo laminar ($0,36 - 0,54 \text{ m s}^{-1}$)

1.6 Contagem de partículas

Partículas não viáveis são monitoradas através de contadores de partículas que não fazem distinção entre as partículas viáveis e não viáveis, mas que são muito mais desenvolvidos tecnicamente do que amostradores de ar. Contadores de partículas foram desenvolvidos pelas forças armadas americanas nos anos 60, para uso na indústria aeroespacial. Foram depois aplicados para as indústrias de semicondutores e farmacêutica. (JASON, 2005).

Monitoramento rotineiro de partículas é muito útil pela rápida detecção de desvios significantes em uma sala limpa. Um resultado fora do nível de classificação em um determinado local deve ser investigado até sua causa raiz. A extensão de investigação deve ser consistente e deve incluir uma análise de tendência. Ações para correção devem ser implementadas para evitar desvios futuros. (GUIDANCE FOR INDUSTRY, 2004).

O usuário que optar pela compra de um contador de partículas (Figura 5), tipicamente leva em consideração fatores como preço, qualidade, tempo de vida do laser, garantia e serviço de assistência técnica. (BELEW, 2005).



Figura 5. Contador de partículas portátil.

1.7 Controle microbiológico

O controle microbiológico efetivo de uma sala limpa requer a compreensão dos fatores de risco de contaminação associados, das etapas de remediação e efetiva prevenção e dos requerimentos regulatórios com o uso de produtos e procedimentos estabelecidos.

Até recentemente, guias de autoridades regulatórias sobre esse assunto tem sido muito escassos, especialmente com relação à validação de desinfecção. Embora a agência americana de controle de alimentos e medicamentos (FDA) não tenha ainda liberado um manual de aplicação e validação de desinfetantes, muitas observações e cartas de advertência têm sido emitidas por assuntos relacionados à aplicação de desinfetantes, incluindo inadequações de validações. Essas observações podem ser vistas como um guia informal.

Adicionalmente, a USP (United States Pharmacopeia) descreveu um capítulo (1072) sobre desinfetantes e antisépticos, que tem sido de valiosa ajuda para aqueles envolvidos com controle microbiológico de salas limpas e validação de desinfetantes. Esse capítulo é atualmente, uma revisão “em processo” que pode ser encontrada na USP 29 (3). As principais seções da USP 1072 são as seguintes:

A introdução faz referência aos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação atuais relativos ao desenho do sistema e seleção de materiais e como esses aspectos estão relacionados à fabricação adequada de produtos farmacêuticos. A USP 1072 inclui informações sobre sanitização de superfícies rígidas e da pele, pois ambos são reconhecidamente importantes para a manutenção do controle microbiológico em áreas de produção farmacêutica (SARTAIN, 2004)

Existem basicamente três tipos de controles microbiológicos em salas limpas. São eles: controle microbiológico por ar induzido, controle microbiológico por ar sedimentado, e controle microbiológico por contato.

Controle microbiológico por ar induzido: esse método consiste na passagem de um volume conhecido de ar através de uma placa contendo um meio de cultura e posterior contagem das unidades formadoras de colônias (Figura 6),

após o período de incubação da placa. A frequência de amostragem deve ser por turno de operação.

Nenhum dos métodos conhecidos de amostragem por ar induzido tem aceitação universal ou aprovação e cada um deles possui vantagens e desvantagens. Contagens microbiológicas viáveis podem ser significativamente alteradas por inúmeras razões como, por exemplo:

- Distribuição não aleatória de microrganismos no ambiente,
- Imprecisão da técnica de amostragem empregada,
- Vazão de amostragem - com velocidades baixas, (os microrganismos podem não aderir ao meio de cultura), e com velocidades altas (pode ocorrer a dessecação dos microrganismos).



Figura 6. Equipamento de amostragem por ar induzido.

Controle microbiológico por ar sedimentado: o uso de placas de sedimentação é um método primitivo para contagem de microrganismos em ambientes. Uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de cultura geleificado, coleta os microrganismos que eventualmente caem sobre ela por gravidade. Esse método é ineficiente para coletar pequenas partículas porque a turbulência em torno da placa pode afetar os resultados, uma vez que pequenas

partículas podem não ser coletadas. São também de difícil validação porque não há nenhuma forma viável de se medir o volume de ar amostrado. Elas devem, no entanto, ser usadas como ferramenta auxiliar de outros métodos de amostragem (Figura 7). O controle por ar sedimentado representa um método barato para se ter uma avaliação, mas não para se obter uma indicação precisa das condições ambientais. A frequência de amostragem deve ser por turno de operação (BUDDEMEYER,2005).



Figura 7. Contagem típica de unidades formadoras de colônias em uma placa de sedimentação.

Controle microbiológico por contato: o controle microbiológico por contato é realizado através de placas chamadas RODAC (**R**eplicate **O**rganism **D**etecting **A**nd **C**ounting), conforme a Figura 8.



Figura 8. Placas RODAC

Superfícies podem ser contaminadas de várias formas: sedimentação de microrganismos e toque do operador, são alguns exemplos. Um dos objetivos da amostragem por contato é determinar a eficiência dos procedimentos rotineiros na remoção da contaminação. Entretanto, a amostragem deve ser realizada antes e depois da desinfecção para determinar a eficiência do procedimento de limpeza. Placas RODAC padrão devem ter meio de crescimento suficiente para gerar uma superfície solidificada acima do nível da placa, e possibilitar a aplicação direta para testar superfícies.

O meio de cultura utilizado deve conter agentes neutralizantes, que inativam quaisquer desinfetantes residuais, na superfície que se quer monitorar. Placas de contato são mais bem utilizadas para detectar microrganismos que podem estar presentes em quantidades relativamente pequenas. Embora sejam bastante úteis, as placas de contato têm limitações, como:

- Não são apropriadas para testar superfícies irregulares;
- Devem ser usadas antes que o meio de cultura se altere pela evaporação da água do meio;

- Problemas de interpretação com certos microrganismos, se o meio de cultura estiver úmido demais ou se a superfície de teste estiver úmida;
- O meio de cultura residual que fica na superfície deve ser removido;
- Placas de contato têm uma baixa recuperação de amostra e somente mostram uma percentagem da presença de contaminação real nas superfícies; e
- O teste somente amostra uma área muito pequena.

A frequência de amostragem mínima recomendada é semanal, porém dependendo do uso combinado ou não de outros métodos de amostragem, esta frequência pode variar. (GUIDELINES ON TEST METHODS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING FOR ASEPTIC DISPENSING FACILITIES, 2004)

Após as amostragens periódicas pelo método acima, as placas são incubadas a 30-35°C durante 2 a 3 dias e posteriormente, a 20-25°C durante 5 a 7 dias, quando então se efetua a contagem do número de unidades formadoras de colônias (HERBIG,2005)

A Tabela 7 estabelece valores limites recomendáveis para contagens microbiológicas em salas limpas.

Tabela 7. Limites recomendados para contaminação microbiológica

Grau da área controlada	Ar induzido	Placas de sedimentação	Placas de contato	Luvas
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Fonte: (EC GUIDE TO GOOD MANUFACTURING PRACTICE , 2003)

Área de grau A: é a área onde ocorrem as operações de maior risco, como por exemplo, enchimento de frascos e ampolas, onde existem frascos e ampolas abertos, onde são feitas as conexões asséticas. Normalmente para essa área é

necessária uma estação de fluxo laminar. A laminaridade do ar deve ser demonstrada e validada.

Área de grau B: é a área adjacente à área A, porém ainda dentro da sala limpa. É o ambiente ao redor da área A.

Áreas de grau C e D: áreas limpas para operações menos críticas na fabricação de produtos estéreis.

1.8 Desinfecção de salas limpas – fumigação com formaldeído

O controle ambiental de microrganismos é muito importante em ambientes críticos, incluindo isoladores, salas limpas, salas de um modo geral e controladas. Tradicionalmente dois métodos têm sido usados: aplicação manual de uma mistura de líquidos desinfetantes e fumigação com formaldeído. Mistura de líquidos desinfetantes são formuladas com potentes biocidas, incluindo agentes oxidantes (cloro, bromo, peróxido de hidrogênio e ácido peroxiacético), fenóis, compostos de amônio quaternários, aldeídos e álcoois.

Uma vantagem importante desses produtos, é que eles podem ser usados para combinar limpeza e desinfecção através de uma aplicação simples de spray com pano. Entretanto, desvantagens incluem a necessidade de remover resíduos, dificuldade de garantir a aplicação em toda a área do ambiente e para áreas críticas, há a necessidade de se fazer a validação de processo. Portanto a fumigação com gás tem sido preferida para grandes aplicações. A fumigação com formaldeído tem sido usada há mais de cem anos. Apesar disso, pouco se tem publicado sobre seus efeitos biocidas.

O gás é gerado por ebulição de paraformaldeído (um pó branco cristalino) em água, ou aquecimento de uma solução de formalina a 37%. É geralmente subestimado, que uma umidade relativa de mais de 70%, é necessária para que a fumigação seja efetiva. Um ciclo típico consiste de umidificação, exposição ao formaldeído e evacuação. Exposições de 18 a 24 horas são necessárias, dependendo do tamanho da sala, do nível desejado de descontaminação e do conteúdo da sala. A evacuação é geralmente alcançada pelo controle de ventilação da sala, para a atmosfera, mas é preferível que os resíduos sejam neutralizados por amônia ou carvão ativado. O processo deve também ser

monitorado quanto à presença de resíduos tóxicos na forma de pó branco. Sob condições controladas, o formaldeído pode demonstrar uma boa eficácia biocida, mas seu uso não é muito desejável devido aos efeitos tóxicos e ao risco carcinogênico. Métodos novos e em desenvolvimento podem ser considerados como alternativas. Eles são primariamente baseados em agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro e ozônio. Peróxido de hidrogênio é o método mais usado, devido à sua combinação única de eficácia antimicrobiana, compatibilidade material e segurança.

Embora o peróxido de hidrogênio seja rotineiramente usado para descontaminação de isoladores, usados para fabricação assética, somente recentemente é que o peróxido de hidrogênio tem sido usado mais amplamente.

Aplicações recentes com peróxido de hidrogênio vaporizado têm incluído descontaminação de salas limpas, ambientes de pesquisa e instalações inteiras. (MACDONNEL, 2003).

1.9 Operação em sala limpa

Somente o mínimo de pessoas necessárias para as operações na sala deve estar presente, e esse aspecto é particularmente importante, durante o processamento dos diversos produtos. Inspeções de controle devem ser efetuadas freqüentemente nas áreas adjacentes à sala limpa de forma freqüente. Todas as pessoas, incluindo aquelas destinadas à limpeza e manutenção das salas limpas, devem receber treinamentos regulares em disciplinas relevantes à correta fabricação de produtos estéreis. Esse treinamento deve fazer referência à higiene e microbiologia básica. Quando pessoas externas que não receberam treinamento têm de entrar em uma sala limpa, cuidados especiais como acompanhamento e supervisão durante esse período devem ser realizados. Pessoas que trabalham com processamento de tecidos animais ou cultura de microorganismos que não aqueles utilizados nos processos de manufatura não devem entrar em uma sala limpa, sem antes seguir um rigoroso procedimento de limpeza e desinfecção.

Movimentos rápidos na sala podem gerar uma inaceitável turbulência na área crítica. Tais movimentos perturbam o fluxo de ar unidirecional apresentando

um desvio entre o desenho de sala limpa pretendido e os parâmetros de controle. O princípio de movimentos vagarosos e cuidadosos deve ser sempre seguido em salas limpas. (GUIDANCE FOR INDUSTRY ,2004)

Altos padrões de higiene pessoal e limpeza são essenciais e todo o pessoal envolvido na fabricação de preparações estéreis devem ser orientados a reportar qualquer evento anormal ocorrido durante o processo, além de terem de submeter se a revisões periódicas de saúde.

As trocas de uniforme e a lavagem do corpo devem estar descritos em procedimento de forma a minimizar o risco de contaminação, além disso, nenhum tipo de jóia, ou cosmético é permitido dentro de uma sala limpa.

O uniforme usado e sua qualidade devem ser apropriados para o processo. Deve ser sempre utilizado, na medida em que protege o produto.

As roupas utilizadas nos mais variados processos, devem ser confeccionadas com padrões especiais de costura (rebatida), evitando o desprendimento de particulados no ambiente e possível contaminação. Tecidos de alta tecnologia com barreiras antimicrobianas, tratamento especial de repelência a fluidos, são utilizados, justificando a sua troca diária, bem como o acompanhamento de sua vida útil.

O uniforme a ser utilizado em Salas Limpas usualmente consiste em conjunto composto de macacão sem bolsos e mangas tipo raglan, proporcionando maior mobilidade e conforto ao operador. Capuzes deverão se ajustar devidamente em torno da cabeça, luvas de vinil ou látex, as quais deverão estar previamente isentas de pó do talco, botas com solados em látex ou borracha irão compor o conjunto, o qual deverá ser totalmente lavável.

As roupas devem ser higienizadas em condições severas de limpeza, sendo acondicionadas em embalagens lacradas a vácuo. Conjuntos utilizados em Salas Limpas Classe "10.000" devem ser higienizados e acondicionados em condições de Classe 100. A cada lavagem a roupa deve passar por uma rigorosa inspeção para verificar eventuais desgastes.

Para as salas limpas, onde ocorre o enchimento dos produtos, o operador deve usar capuz cobrindo totalmente o cabelo, e acomodado por dentro do macacão previamente esterilizado. Uma máscara facial deve ser usada para

evitar a liberação de gotículas de saliva. Um par de luvas de borracha, apropriadas e esterilizadas devem ser usadas durante todo o tempo de operação na sala limpa, assim como um par de sapatilhas adequadas e esterilizadas que devem ser de material apropriado para não liberar partículas. As luvas devem ser regularmente desinfetadas durante a operação. Máscaras e luvas devem ser substituídas a cada operação de trabalho. As vestimentas de uma sala limpa devem ser lavadas e manuseadas de forma a não adicionar contaminantes às mesmas, que podem ser futuramente espalhados na sala. Essas operações devem seguir procedimentos escritos. Deve haver uma lavanderia especialmente destinada à lavagem desses uniformes, pois a mistura com roupas comuns pode contaminar os uniformes com partículas que são liberadas na sala limpa, quando os mesmos forem utilizados novamente.

O operador pode ser definido como um gerador de partículas de amplo espectro, envolvido por um filtro mecânico ineficiente que pode também ser fonte de partículas. Pode ser capaz de gerar e liberar partículas químicas e biológicas no ambiente, juntamente com cargas elétricas potencialmente destrutivas. Na indústria de semicondutores e na farmacêutica, esta contaminação pode degradar o produto e na área de cuidados médicos de saúde pode resultar em infecção cruzada entre pacientes e equipe médica.

Vestir adequadamente o operador é um dos principais desafios quando o objetivo é conceber uma sala limpa para produção de medicamentos, atendendo a todas as especificações de limpeza do ar e de Boas Práticas de Fabricação.

Da mesma forma que são utilizados filtros para controlar a contaminação do ar que entra na sala limpa, a vestimenta funciona como um filtro do operador, e deve agregar as seguintes funções:

- Proteger o ambiente das partículas geradas pelo operador,
- Proteger o processo das partículas geradas pelo operador,
- Proteger o operador das partículas geradas pelo ambiente pelo processo (como Equipamento de Proteção Individual),
- Ter baixa liberação de partículas, dissipação eletrostática e ser passível de esterilização.

A necessidade gerada pelos locais, onde o controle de contaminação passou a ser pré-requisito para alcançar níveis de qualidade de produtos e serviços, foi acompanhada pelo olhar atento da indústria de tecidos. O desafio e objetivo é desenvolver tecidos que oferecessem controle, com relação a partículas viáveis e não viáveis, com conforto e segurança ao operador, a um custo compatível de ser incorporado ao produto ou serviço.

As primeiras roupas fabricadas especificamente para a área cirúrgica eram feitas de tecido 100% algodão, e posteriormente surgiram misturas de poliéster e algodão, com acabamento repelente à água. Esta mistura conferia ao produto final uma resistência maior à lavagem, além de maior proteção.

Na década de 70, o tecido descartável resultante da mistura de poliéster e polpa de madeira, e que era esterilizável, tornou-se popular. Entretanto permitia o uso uma única vez, pois não era resistente à lavagem e isto acabou aumentando custos hospitalares, além de que os hospitais deveriam providenciar a inutilização da roupa. Em 1987, uma nova geração de tecidos foi introduzida, os tecidos Compel e similares, destinados inicialmente ao uso hospitalar. Fabricados com filamento 100% poliéster, apresentavam trama cerrada de alta densidade, o que acarretava excelente propriedade de barreira natural e filtração, repelência a líquidos, além de serem leves e livres de fiapos. A inibição do crescimento microbiano era garantida por meio de aplicação de composto antimicrobiano durável, de amplo espectro, que não soltava tecido, não permitia contaminação cruzada e mantinha efetividade durante o ciclo de vida da roupa.

Restava ainda o problema decorrente do tecido 100% poliéster, ou seja, a carga eletrostática inerente tornava a roupa desconfortável devido à aderência estática, aliada ao perigo permanente de emissão de faíscas no centro cirúrgico. Para solucionar este problema, foi introduzido fio *Eletrostática Discharge* (ESD), com dissipante eletrostático entre fibras, que agregava conforto ao tecido, permitia a dissipação eletrostática e adicionalmente aceitava mais facilmente os processos de descontaminação e esterilização.

Em período semelhante, a indústria farmacêutica também precisava de aperfeiçoamento nos tecidos até então utilizados. A utilização de descartáveis pelos mesmos motivos que nos hospitais, acrescentou custo ao processo de

produção. A alternativa reutilizável veio com os tecidos com fios de poliéster de filamento contínuo em padrão espinha de peixe, que não soltavam fiapos, permitiam múltiplas lavagens e esterilizações, além de acrescentar conforto ao operador e serem disponíveis na indústria têxtil. Entretanto estas vestimentas apresentavam barreira de permeabilidade ao ar relativamente alta, além de tendência ao encolhimento e enrugamento após sucessivas lavagens e esterilizações.

Não demorou para que a indústria farmacêutica identificasse e passasse a utilizar tecidos inicialmente desenvolvidos para a área hospitalar. Estes tecidos apresentavam alta eficiência de filtração bacteriana, o que os tornava especialmente úteis em aplicações assépticas. A carga microbiana na sala limpa foi drasticamente reduzida, mesmo com a roupa sendo utilizada por muitas horas. A presença de acabamento antimicrobiano durável no tecido impedia o crescimento e reduzia o aumento bacteriano (biopermeação). Durante o manuseio de fluidos perigosos, a aplicação de repelentes a líquidos garantia a segurança do operador. Finalmente a dissipação da carga eletrostática, que nos hospitais, tinha o objetivo de impedir acidentes com faíscas e descargas no centro cirúrgico, na indústria farmacêutica tem a função de manter distante do operador, partículas viáveis ou não viáveis, que podem ser atraídas pela roupa com carga.

As roupas com fio ESD, que dissipam a carga eletrostática, apresentam probabilidade menor de causar migração microbiana resultantes de forças eletro-indutivas. Desta forma, mesmo que por razões diferentes, a indústria farmacêutica adotou a partir de então, tecidos utilizados nas aplicações hospitalares.

Nos ambientes da indústria farmacêutica, este avanço na eficiência de filtração, é altamente benéfico. Considerando que microrganismos são partículas que se multiplicam em razão logarítmica quando encontram condições favoráveis de umidade e calor, o ambiente humano formado no interior da vestimenta pode ser considerado uma zona de amplificação. Dentro da roupa estão disponíveis as proteínas geradas pelo homem que é alimento para as bactérias, que contam ainda com condições de calor e umidade que garantem a sobrevivência destes microrganismos. Conter e controlar a migração dessas partículas, é o grande desafio constantemente buscado pelas indústrias de tecidos, para atender à

demanda cada vez mais crescente das indústrias farmacêuticas, de serviços de saúde e de microeletrônica. (TARGA, 2006).

1.10 Legislação brasileira

A seguir é apresentado um trecho extraído da norma RDC 210 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, atualmente em vigor, sobre Boas Práticas de Fabricação de produtos farmacêuticos.

A produção de preparações estéreis deve ser feita em áreas limpas, cuja entrada de pessoal e de materiais deve ser feita através de câmaras de passagem. As áreas devem ser mantidas dentro de padrões de limpeza apropriados e devem ser providos de sistemas de ventilação com filtros de eficiência comprovada.

As diversas operações envolvidas no preparo dos materiais (tais como: recipientes e tampas), no preparo do produto, no enchimento e na esterilização devem ser realizadas em áreas separadas dentro da área limpa.

As áreas limpas utilizadas na fabricação de produtos estéreis são classificadas, segundo as características exigidas para a qualidade do ar, em graus A, B, C e D (Tabela 8).

Tabela 8. Limites para contagem de partículas

Grau	Em descanso		Em operação	
	Numero máximo permitido de partículas m ⁻³		Numero máximo permitido de partículas m ⁻³	
	0,5-5,0 µm	Acima de 5,0 µm	0,5-5,0 µm	Acima de 5,0 µm
A	3.500	0	3 500	0
B	3.500	0	350.000	2.000
C	350.000	2.000	3.500.000	20.000
D	3.500.000	20.000	Não definido	Não definido

Fonte: WHO Technical Report Series, Nº. 902, 2002.

Para se obter o ar com as características exigidas, devem ser utilizados métodos específicos e deve ser observado que:

- Os sistemas de fluxo laminar de ar devem ter velocidade homogênea de cerca de $0,30 \text{ m s}^{-1}$ em caso de fluxo vertical, e de $0,45 \text{ m s}^{-1}$ em caso de fluxo horizontal. A precisão da velocidade do fluxo de ar depende do tipo de equipamento;
- Para que os graus B, C e D sejam alcançados, o número de trocas totais do ar da área, geralmente deve ser superior a 20 trocas por hora, em uma sala com padrão apropriado de fluxo de ar com filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air);
- Para que a determinação de baixa contaminação do ar seja confiável, o tamanho das amostras de ar deve ser grande e suficiente;
- Os diferentes sistemas de classificação de partículas no ar para áreas limpas estão apresentados na Tabela 8; e
- Pode haver dificuldade na demonstração de conformidade à classificação de ar no ponto de envase, durante essa operação, devido à formação de partículas/gotículas provenientes do próprio produto.

Cada operação de produção requer um nível determinado de pureza do ar para que sejam minimizados os riscos de contaminação por partículas ou de microrganismos nos produtos ou materiais que estiverem sendo manipulados. Os níveis de partículas e de microrganismos apresentados na Tabela 1 devem ser mantidos nos arredores imediatos do produto, sempre que ele estiver exposto ao ambiente. Essas condições devem também ser respeitadas em todas as áreas circundantes.

Se, por qualquer motivo, as condições do ar na área de trabalho não forem mantidas de acordo com as condições pré-estabelecidas, deve ser realizado procedimento de limpeza / sanitização para se atingir as condições adequadas.

A utilização da tecnologia de barreira absoluta (sistemas fechados) e de sistemas automatizados para minimizar a intervenção humana nas áreas de produção pode trazer vantagens à manutenção da esterilidade dos produtos fabricados. Quando forem utilizadas tais técnicas, as recomendações quanto à qualidade do ar e seu monitoramento devem ser aplicadas e feita a interpretação apropriada dos termos "local de trabalho" e "ambiente" (ANVISA RDC 210,2003).

1.11 Norma ISO 14644

Foi criada na União Européia (1999) e introduzida nos Estados Unidos da América em 2001. Há uma tendência de que a ISO 14644 substitua a norma *Federal Standard 209* nos EEUU. Ela é dividida em 8 partes:

Parte 1: Classificação da limpeza do ar – define classificações de salas e concentrações de partículas associadas a estas classificações, além de métodos de medição dessas concentrações.

Parte 2: Determina os intervalos de testes para avaliação da conformidade das salas limpas .

Parte 3: Metrologia e métodos de teste – descreve os métodos de testes para as salas limpas para validar sua condição de conformidade com a norma.

Parte 4: Projeto, construção e operação – descreve o projeto e a construção de uma sala limpa.

Parte 5: Operação – são orientações de como operar em uma sala limpa.

Parte 6: Termos e definições – fornece uma coleção de termos e definições sobre salas limpas utilizados na norma ISO.

Parte 7: Dispositivos separadores – trata dos dispositivos limpadores de ar e mini-ambientes, especialmente preparados para níveis de limpeza superiores.

Parte 8: Contaminação molecular – trata da contaminação gasosa em salas limpas. (AIDOS,2006)

1.12 Microbiota da pele

A superfície da pele apresenta diversos tipos de micro-ambientes, em áreas mais secas ou mais úmidas, que apresentam populações bacterianas mais esparsas ou mais densas, respectivamente. Nas regiões mais úmidas, como axilas, virilhas, espaço entre os dedos dos pés, genitália e períneo, predominam organismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* sp.

Nessas áreas, condições como umidade, maior temperatura corporal e maior concentração de lipídios cutâneos de superfície favorecem o crescimento bacteriano. Nas áreas secas predominam as bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*.

De modo geral, organismos Gram-positivos são os membros predominantes da superfície corporal. A bactéria *S. epidermidis* é o habitante mais numeroso da pele correspondendo à cerca de 90% da microbiota residente em algumas áreas. Em determinadas situações, as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* podem causar doenças de pele e afecções nos cílios denominadas de blefarites, as quais podem evoluir para conjuntivites bacterianas.

A quantidade de bactérias vivas na pele de um indivíduo é relativamente constante. A extensão das áreas colonizadas depende parcialmente da exposição da pele a condições particulares e parcialmente da atividade bactericida da própria pele. Um alto grau de especificidade está envolvido na aderência de bactérias nas superfícies epiteliais. Nem todas as bactérias são capazes de se aderir à pele.

A sudorese profusa, a lavagem e o banho não conseguem eliminar ou modificar significativamente a flora residente normal

Os folículos pilosos da pele são colonizados por bactérias não virulentas, que impedem a implantação de microrganismos patogênicos, constituindo a microbiota resistente. Já a microbiota transitória compreende microrganismos que não colonizam sendo assim de fácil remoção.

A análise da microbiota da pele e mucosa deveria ser feita periodicamente nos indivíduos que lidam com os medicamentos, pois estes podem ter colonizado na microbiota residente bactérias patogênicas como a *Pseudomonas* e o *Staphylococcus aureus*, o que apresenta um grande risco de contaminação. O controle de infecção e a biossegurança é de grande importância para a prática dos manipuladores de medicamento, a preocupação quanto à contaminação é um tema bem discutido no meio da saúde existindo então, vários estudos em desenvolvimento.

A conduta dos profissionais que trabalham em estabelecimentos que fabricam ou comercializam artigos médicos ou medicamentos, interfere diretamente na qualidade final dos produtos. As pessoas são consideradas a maior fonte de contaminação nesses ambientes, pois possuem na microbiota, condições capazes de gerar inúmeros contaminantes.

2 METODOLOGIA

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 Resumo da proposta

Durante os anos de 2006 e 2007, após análise dos resultados de monitoramento microbiológico das salas limpas estudadas, observou-se uma incidência maior de contaminações acima dos limites de alerta e ação, mais especificamente nos testes por contato na região abdominal dos operadores. Buscou-se então o desenvolvimento de uma barreira adicional entre a pele do operador e o uniforme, de forma a tentar reduzir ou eliminar essas contaminações

Inicialmente foi testado um avental de papel e prolipileno, mas o mesmo causava um certo desconforto nos operadores e, sendo assim, foi desenvolvida uma camiseta. A idéia consiste na utilização de uma camiseta de polipropileno, conforme Figura 9, sob o uniforme utilizado na sala limpa. Pretende-se evitar que partículas viáveis (microrganismos), provenientes dos corpos dos operadores, não ultrapassem os uniformes de trabalho e sejam detectadas nas análises de contato nos monitoramentos diários de rotina das duas salas limpas.

2.1.2 Preparação e uso da camiseta

A camiseta é composta de um material trilaminado, que oferece: barreira microbiana, repelência à partículas secas e úmidas, alto poder de cobertura, atóxico, alta resistência ao rasgo, compatibilidade com qualquer agente esterilizante, excelente preservação da esterilidade dos produtos, além de não propagar fogo.

Este material já era utilizado como agente de limpeza das salas limpas, e foi observado que poderia ser também utilizado como barreira.



Figura 9. Camiseta empregada como barreira

Foi então enviada para a sala limpa onde foi vestida diretamente sobre a pele do operador e sob o uniforme (Figura 10).



Figura 10. Camiseta usada pelo operador.

2.1.3 Preparação das placas de contato

Alguns controles são importantes para garantir confiabilidade na utilização de placas de contato no monitoramento de superfícies. Sendo assim, a seguir são descritas ações e observações que são importantes para a confiabilidade dos resultados de monitoramento.

É imprescindível que os meios de cultura adquiridos possuam certificado de análise, onde informações importantes como data de validade e condições de estocagem estejam descritas. No certificado de análise de meios de cultura adquiridos prontos para uso, além das informações acima descritas, deve estar incluído o controle de qualidade dos microrganismos usados na promoção de crescimento e o teste de seletividade daquele meio, pelo fabricante.

Os meios de cultura devem ser preparados com água purificada. Uma balança calibrada na faixa de peso adequada deve ser utilizada, assim como vidrarias e acessórios limpos, evitando dessa forma que substâncias estranhas venham a alterar a composição do meio final preparado. Caso seja necessário, aquecer o meio para uma melhor dissolução do pó. Deve-se ter cuidado com o excesso de calor, para que não haja degradação do mesmo. Um indício de que o meio possa ter sofrido degradação é seu escurecimento. Uma adequada agitação do meio pode ser necessária, após a adição de suplementos ao meio, quando requeridos, para sua melhor homogeneização. Os meios preparados devem ser esterilizados no mesmo dia do preparo.

Mesmo dentro do prazo de validade, seja validado internamente pela promoção de crescimento ou informado pelo fabricante, é importante que sejam observadas as características originais do meio como cor, consistência do agar e turbidez e, caso alguma alteração importante seja notada, o meio deve ser descartado. Os meios de cultura feitos ou distribuídos em frascos com tampas de rosca são válidos, segundo Farmacopéia Americana, por um ano, devendo ser avaliado quanto à promoção de crescimento e aspecto a cada três meses. Os meios de cultura após sua distribuição em placas devem ter validade de um mês. A determinação dessa validade foi definida através de validação local. Quando fornecida por terceiros, a validade respeita o informado pelo fabricante no

certificado de análise. No entanto é importante registrar que essas validades foram confirmadas internamente por validação .

Os meios de cultura devem ser acondicionados à temperatura ambiente. As placas preparadas no laboratório devem ter identificação do nome do meio e da data de preparo e validade. As placas não devem ser estocadas em temperaturas abaixo de 0 °C, pois o congelamento pode causar danos ao meio e devem ser mantidas protegidas de luminosidade e temperaturas excessivas. A faixa de temperatura ideal para conservação das placas deve ser de 2 a 8 °C.

O pH de cada lote de meio de cultura deve ser confirmado antes e após o processo de esterilização. Na avaliação do meio pode ser acoplado ao potenciômetro um eletrodo com sonda plana, para que seja feito contato direto na superfície do agar. A variação não deve ser maior que $\pm 0,2$ do valor indicado no frasco pelo fabricante.

O meio de cultura utilizado para os testes de contato foi o agar tripticaseína de soja da BBL™ (Trypticase Soy Agar with Lecithin and Polysorbate 80 cat Nr 211764 dehydrated – 500g). As placas de contato, também denominadas em inglês de *RODAC* (*Replicate Organism Detection And Counting*), são preparadas da seguinte forma:

- Suspensão de 45,7 g de pó do meio de cultura agar tripitcaseína de soja com lecitina e polissorbato 80 em 1 litro de água purificada (água potável purificada por processos de filtração ou osmose reversa);
- Mistura intensa até dissolução, completando esta etapa através de aquecimento e fervura do meio;
- Autoclavação do meio preparado em balão apropriado por 15 minutos à 121° C;
- Enchimento das placas de contato sobre fluxo laminar com o volume de 16,5 a 17,5 mL por placa, fechando as mesmas e incubando por 5 dias a 30-35° C;
- Após este período, utilizam-se no teste de contato, apenas as placas com ausência de crescimento microbiológico.

2.1.4 Monitoramento da superfície da área abdominal

O monitoramento foi realizado com a utilização da camiseta, sempre que as linhas de fabricação se encontravam em operação e obedecendo a seqüência de uma determinação a cada turno de trabalho, uma vez que na mudança de turno ocorria também a substituição do operador da linha. Assim sendo, o número de determinações efetuadas estava diretamente relacionado aos períodos nos quais houve produção.

Cada determinação seguiu as seguintes etapas:

- Antes da utilização, a placa foi pré-incubada e verificada quanto à ausência de contaminação do meio de cultura.
- A placa foi identificada com data e hora da amostragem.
- A placa foi aberta dentro da sala limpa pelo próprio operador e pressionada durante 10 segundos contra o abdômen sobre o uniforme, que é um tempo suficiente, para a coleta de organismos viáveis, além de manter o mesmo padrão de amostragem em todas os testes.
- A placa foi então incubada por 5 dias entre 30 e 35°C
- Após este período, a placa foi inspecionada para verificação de ausência ou presença de crescimento microbiológico e em seguida descartada.

É importante ressaltar que, de acordo com o procedimento padrão de operação das linhas de produção analisadas, somente se buscou a identificação dos microrganismos, quando o limite de alerta, com relação ao controle microbiológico foi ultrapassado. Além disso, muitas das investigações puderam chegar apenas ao tipo de microrganismo, bactérias, fungos ou leveduras, pois não houve resposta ao método de identificação com relação ao gênero e espécie.

De acordo com o procedimento operacional padrão das linhas analisadas, os limites de alerta e ação, quando ultrapassados, devem ser investigados e suas possíveis causas eliminadas, através de ações estabelecidas. Porém, essas análises e ações, não fizeram parte do conteúdo deste trabalho, uma vez que o foco do mesmo foi o uso da camiseta, como barreira.

Deve-se ainda ressaltar que os limites de alerta e ação foram alterados durante o período de coleta de dados da seguinte forma:

- Em outubro de 2004 o limite de alerta foi mantido em ≥ 3 UFC/placa e o limite de ação passou de ≥ 15 UFC/placa para ≥ 5 UFC/placa.
- Em agosto de 2005 o limite de alerta passou de ≥ 3 UFC/placa para ≥ 1 UFC/placa e o de ação passou de ≥ 5 UFC/placa para ≥ 3 UFC/placa.

Portanto todo o trabalho de investigação da forma, gênero e espécie de microrganismos foi norteado por esses critérios e por essas alterações ao longo do período estudado. Assim sendo, é possível que o tipo de colônia encontrado em determinado período, não tenha sido identificado, pelo fato do limite de ação na época da contaminação, não ter sido atingido.

2.1.5 Identificação dos microrganismos

As análises microbiológicas efetuadas seguiram os seguintes procedimentos :

a) Isolamento de colônias e purificação de culturas

Ao detectar-se crescimento microbiano no meio, observou-se atentamente a placa para verificar se havia apenas um tipo de colônia ou mais. Para o isolamento e purificação das culturas, retirou-se uma pequena porção da parte central da colônia com alça bacteriológica estéril e semeou-se em placa contendo meio de cultura sólido não seletivo TSA ou agar sangue, através do esgotamento do inóculo por estrias.

Não havendo suspeita de que tipo de microrganismo estava sendo isolado (bactérias, fungos miceliados ou leveduras), incubou-se a placa entre 30 e 35°C, durante 24 a 72h.

Se, pelo aspecto da colônia, fosse possível classificar o microrganismo em um dos três grupos citados acima ou se a cultura fosse uma cepa padrão, incubou-se a placa, conforme descrito abaixo:

- Bactérias aeróbias: temperatura entre 30 e 37 °C, de 24 a 72 h;
- Bactérias anaeróbias: em jarra de anaerobiose contendo inibidor de oxigênio em temperatura entre 30 e 37°C, de 24 a 72h.

b) Identificação Macroscópica de Fungos Filamentosos

Por possuírem características específicas com relação ao aspecto da colônia, os fungos filamentosos podem ser diferenciados de bactérias e leveduras apenas através da observação das colônias. As colônias de fungos filamentosos são constituídas por elementos multicelulares em forma de tubos (hifas). O conjunto de hifas é denominado de micélio e o mesmo se desenvolve no interior do substrato. As colônias são cotonosas ou em forma de pó(secas) e podem apresentar várias colorações, sendo estas distintas nos dois versos da placa de Petri.

c) Identificação Macroscópica de Bactérias e Leveduras

Existem diversas morfologias de colônias de bactérias e leveduras e os principais pontos a verificados foram:

- Tamanho da colônia
- Coloracao;
- Opacidade, transparência e translucidez;
- Forma;
- Elevação;
- Superfície;
- Bordas;
- Formacao de mucos.

d) Identificação Microscópica de Bactérias e Leveduras

Para classificar uma colônia como sendo de bactérias ou leveduras, fez-se necessário realizar uma identificação microscópica, para a observação das características celulares.

Realizou-se então a coloração de Gram, para que, além da classificação do microrganismo como levedura ou bactéria, também se pudesse classificá-lo no segundo caso, como Gram positivo ou Gram negativo.

A coloração de Gram é um método de coloração diferencial utilizado em microbiologia que permite a classificação dos microrganismos em dois grupos: os

gram positivos (+), que após a coloração apresentam cor violeta; e os gram negativos (-), que após a coloração apresentam cor vermelha ou rosa escuro.

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona, enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem. Esta diferença se deve às diferenças existentes na composição química da parede celular dos microrganismos (BIER, 1990).

e) Identificação bioquímica de microrganismos

A identificação bioquímica de microrganismos foi realizada através do equipamento Vitek, que consiste em um sistema automatizado para identificação de bactérias e leveduras. As unidades de leitura são conhecidas como cartoes, cujas respostas bioquímicas conduzem as leituras específicas de variações colorimétricas e de turbidez.

Embora o Sistema Vitek identifique as principais espécies de microrganismos de interesse em ambientes e preparações farmacêuticas, assim como, as cepas padrão estocadas no Laboratório de Controle Microbiológico, existem alguns grupos de microrganismos específicos que necessitam de outros métodos para serem identificados, como as bactérias corineformes e os lactobacillus. Para identificar esses microrganismos utilizou-se os kits de identificação API bioMerieux.

Cada cartão de identificação, denominado de cartão Vitek, possui 30 poços que contem substratos bioquímicos sob uma forma desidratada.

São os seguintes os tipos de cartões Vitek utilizados:

- Cartão GNI - utilizado na identificação de bacilos gram-negativos fermentadores, membros da família *Enterobacteriaceae*. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 1 na escala *Mc Farland*, ou seja, a zona azul no colorímetro *Vitek*.
- Cartão NFC - utilizado na identificação de bacilos gram-negativos não-fermentadores. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 1 na escala *Mc Farland*, ou seja, na azul no colorímetro *Vitek*.

- Cartão GPI - utilizado na identificação de cocos gram-positivos (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*) e outros microrganismos Gram (+), como por exemplo algumas espécies do gênero *Corynebacterium*. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 0,5 na escala *Mc Farland* , ou seja, a zona vermelha no colorímetro *Vitek* .
- Cartão BAC - utilizado na identificação de bacilos gram-positivos pertencentes à família *Bacillaceae*, como por exemplo o gênero *Bacillus*. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 0,5 na escala *Mc Farland* ,ou seja, a zona vermelha no colorímetro *Vitek* .
- Cartão ANI - utilizado na identificação de bactérias anaeróbias e microaerofilas. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 3 na escala *Mc Farland*, ou seja, a zona amarela no colorímetro *Vitek* .
- Cartão YBC - utilizado na identificação de leveduras. A suspensão do microrganismo em salina deve corresponder a 2 na escala *Mc Farland*, ou seja, a zona verde no colorímetro *Vitek* .
- De acordo com o resultado da coloração de gram, semear o microrganismo em meio de cultura adequado conforme a seguir:
 - Cocos gram-positivos (agar sangue)
 - Bacilo gram-negativo (agar sangue)
 - Bacilo gram-positivo Agar Trypticase de soja (agar tripticaseína de soja - TSA)
 - Levedura Agar saboraud dextrose (agar saboraud dextrose - SDA)

. Após não mais que 24 horas de incubação no agar apropriado, devem-se realizar alguns testes bioquímicos preliminares, dependendo das características morfológicas e tintoriais dos microrganismos conforme abaixo:

- Bacilos gram-negativos - teste de fermentação de glicose e teste de oxidase.
- Cocos gram-positivos - teste da catalase, coagulase e propriedades hemolíticas.

Após o resultado da coloração de Gram e dos testes bioquímicos necessários, verificou-se através do esquema da Figura 11, qual o cartão Vitek a ser utilizado:

f) Descrição dos testes enzimáticos e bioquímicos preliminares

- Teste de Oxidase: este teste é utilizado para diferenciar microrganismos produtores da enzima citocromooxidase dos não produtores. Realizar o teste de oxidase, retirando-se uma alçada da colônia isolada e esfregando-a sobre uma tira indicadora do teste. O aparecimento de uma mancha roxa na tira indica reação positiva para oxidase.
- Teste de Catalase: a catalase é uma enzima que atua sobre o peróxido de hidrogênio, desdobrando-o em água e oxigênio. O teste da catalase é utilizado principalmente para diferenciação entre os *Staphylococcus*, que são catalase positivos e os *Streptococcus*, que são catalase negativos. Realizar o teste de catalase (peroxidase) aplicando-se de uma a duas gotas da solução de H₂O₂ 1% sobre a colônia. A ocorrência de efervescência indica reação positiva para catalase. Este teste não deve ser realizado sobre agar-sangue, pois haveria sempre reação positiva, devido à presença de hemácias. Neste caso deve-se realizar o teste em lâmina de vidro ou em outro meio de cultura.
- Teste de Coagulase: este teste detecta a produção de coagulase livre e é utilizado para a diferenciação entre espécies de *Staphylococcus*. Os *S. aureus* são coagulase positivos e as outras espécies de *Staphylococcus* são coagulase negativos. Realizar o teste de coagulase, segundo o boletim técnico que acompanha o kit.
- Propriedades Hemolíticas: teste que avalia os tipos de hemólise de culturas do gênero *Streptococcus* em meio de cultura contendo sangue (agar sangue). Este teste deve ser feito para colônias de cocos gram-positivos catalase-negativos. Avaliar as características do meio agar sangue ao redor das colônias para classificá-las em dois grupos: 1. β -hemolíticos: causam a lise total das hemácias 2. Não β -hemolíticos: podem

ser α -hemolíticos (causam a lise parcial das hemácias) e γ -hemolíticos (não causam a lise das hemácias).

- Teste de Fermentação de Açúcares (em agar TSI): este teste é utilizado para diferenciar os bacilos Gram negativos Fermentadores dos Não Fermentadores de glicose. Utilizar o meio de cultura agar Triplice Acucar-Ferro (TSI). Preparar o meio de cultura em tubos inclinados, de modo que o fundo e a parte inclinada tenham comprimento igual (cerca de 3 cm cada). A porção inclinada, exposta ao oxigênio e aeróbia e o fundo, que esta protegido do ar, e relativamente anaeróbio. Para inoculação do meio tocar a colônia em estudo com a extremidade da agulha de inoculação e em seguida introduzir na profundidade (fundo) do agar. A agulha deve ser retirada do fundo do agar, seguindo-se a linha de inoculação e então a porção inclinada deve ser semeada em estrias. Incubar o meio a 35°C, durante 24h. Após o período de incubação observar as porções do tubo com relação a cultura e classificar o microrganismo como Fermentador ou Não Fermentador de glicose.
- A coloração vermelha indica alcalinidade, a amarela indica acidez e a preta indica acidez com produção de H₂S. Os resultados devem ser avaliados utilizando-se a Tabela 9 e através da Figura 11 deve ser escolhido o cartão a ser utilizado para identificação do microrganismo em estudo.

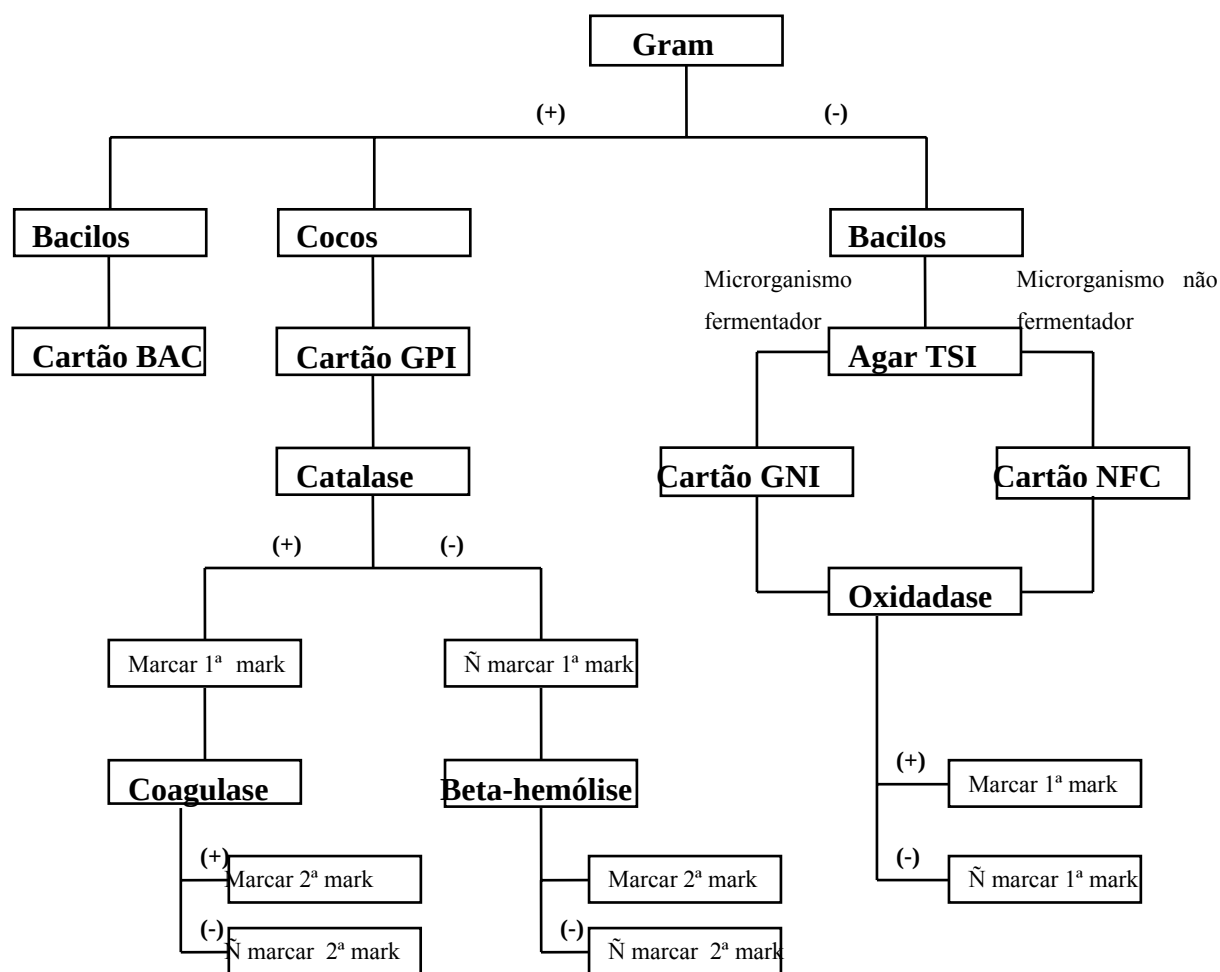


Figura 11. Esquema dos testes preliminares e escolha dos cartões Vitek para identificação de microrganismos.

Tabela 9. Interpretação do teste de fermentação de carboidratos

Resultados	Interpretação	Exemplos
Pico alcalino (vermelho) Fundo alcalino (vermelho)	Ausência de fermentadores de carboidratos	<i>P.aeruginosa</i>
Pico alcalino (vermelho) Fundo ácido (amarelo)	Fermentação de glicose, ausência de fermentação de sacarose e lactose	Espécies de <i>Shigella</i>
Pico ácido (amarelo) Fundo ácido (amarelo)	Fermentação de glicose, lactose e / ou sacarose	<i>E.coli</i> e espécies de <i>Klebsiella</i>
Pico alcalino/Fundo ácido (Preto - H ₂ S)	Fermentação de glicose, ausência de fermentação de lactose e sacarose e produção de sulfeto de hidrogênio	Espécies de <i>Salmonella</i> , <i>Citrobacter</i> e <i>Proteus</i>

A Figura 12 representa um cartão Vitek para identificação de microrganismos e a Figura 13 mostra o equipamento contendo o sistema de incubação à direita onde é feita a leitura, para posterior visualização no monitor. O número de identificação do cartão corresponde à um número seqüencial e único de forma a evitar misturas de laudos e cartões.

- DS .Dash Number - número utilizado para diferenciar colônias numa mesma placa.
- External Mark - local para marcar com caneta marcador para retro projetor os testes enzimáticos positivos.
- Porta de Entrada - local onde deve ser conectado o tubo de transferência.
- As external marks são identificadas de acordo com o resultado dos testes enzimáticos:

a) Bacilo Gram(-) oxidase(+). identificar a 1ª external mark;

b) Cocos Gram(+) catalase(+). identificar a 1ª external mark - identificar a 2ª external mark se também for coagulase(+);

- c) Cocos Gram(+) catalase(-). não identificar a 1ª external mark -
identificar a 2ª external mark se o microorganismo for β -hemolítico.

NOTA: Os testes enzimáticos com resultados negativos não são marcados nas *external marks*.

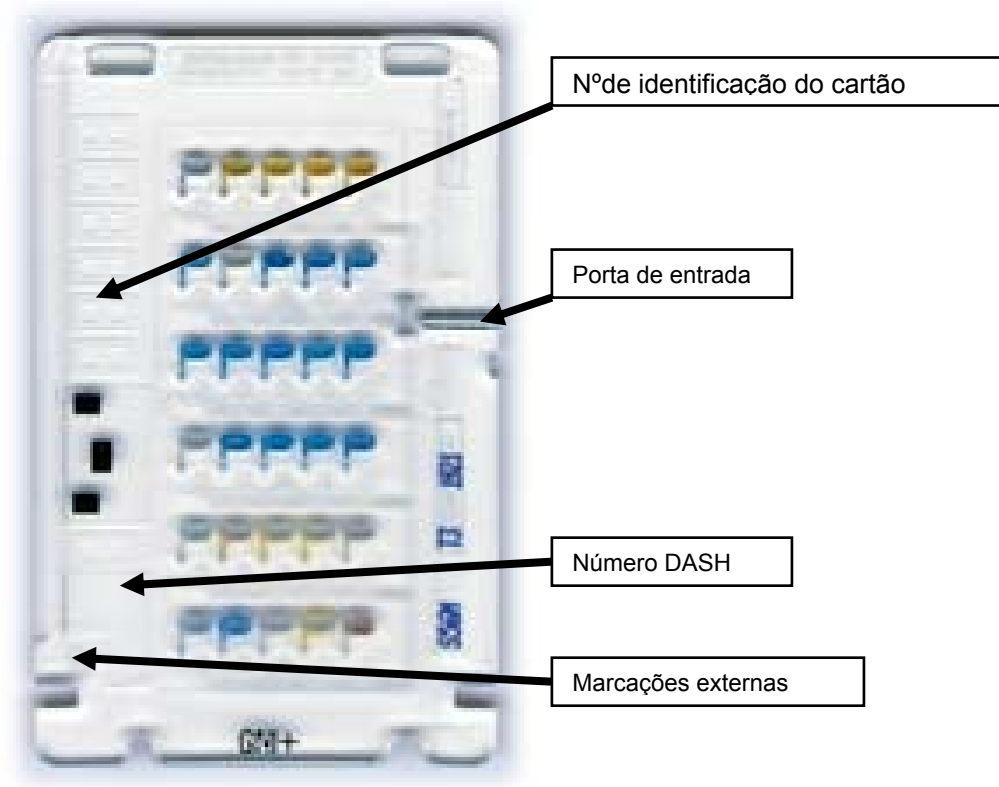


Figura 12 -Cartao Vitek



Figura 13- Sistema Vitek

- Ao ligar o monitor do equipamento aguardar a estabilização e testes.
- Preencher os campos referentes à amostra,
- Após realizar o cadastro da amostra no Sistema Vitek, deve-se escolher o cartão apropriado e preenchê-lo de acordo com o esquema descrito nas Figuras 12 e 13
- Preparar uma suspensão do microrganismo a ser identificado em 1,8 mL de salina estéril 0,45-0,50% em tubo.
- Ajustar a transmitância da suspensão, de acordo com a faixa especificada no colorímetro do Vitek dependendo do tipo de cartão utilizado.
- Registrar no cartão Vitek, o nº de identificação sequencial
- Colocar a haste de transferência no tubo contendo a suspensão do microrganismo e conectá-la ao cartão Vitek.
- Colocar o conjunto descrito acima na estante de suporte e transportar a mesma para o Vitek, para que haja a transferência a vácuo da suspensão para o cartão.
- Observar se o cartão encontra-se devidamente preenchido com a suspensão. Caso o cartão não esteja devidamente preenchido ou apresente muitas bolhas, deve-se repetir todo o procedimento utilizando-se inóculo, haste de transferência e cartão novos.
- Selar o cartão utilizando-se o plug selador.
- Verificar no sistema Vitek o status da próxima coluna (*tray*) a ser lida, ou seja, o horário de leitura e qual das colunas estará disponível para o cartão.
- Observar se a temperatura no display encontra-se entre 35 e 36°C.
- Com o laudo de entrada já preenchido e salvo, inserir o cartão Vitek no leitor-Incubadora na coluna apropriada.
- Em seguida, dar início a leitura.

OBS. O cartão **ANI** não deve ser inserido no Leitor-Incubadora. Após ser inoculado através do vácuo, o cartão deve ser incubado durante quatro horas a

uma temperatura entre 35 e 37°C. Após o tempo de incubação, deve-se realizar a leitura dos testes consultando a planilha do resumo dos resultados **ANI**, que encontra-se no Manual de Referência de Microbiologia Vitek ,e os resultados devem ser adicionados manualmente no Sistema Vitek para que o laudo de Identificação possa ser emitida.

Quando os resultados dos testes do cartão não se assemelham suficientemente ao de qualquer espécie ou grupo de espécies na base de dados do equipamento não é possível apresentar uma identificação aceitável. Sendo por este motivo, as seguintes causas, as mais comumente presentes:

- Demasiados resultados positivos: Esta situação ocorre normalmente quando se utiliza um inóculo misto ou quando existem bolhas no(s) poço(s) de teste.
- Poucos resultados positivos: Esta situação ocorre normalmente quando um cartão não é suficientemente inoculado (suspensão pouco concentrada) ou quando se utiliza uma cultura antiga (com mais de 24 horas).
- O cartão foi inoculado com um isolado que não pode ser uniformemente suspenso na solução salina entre 0,45% a 0,50%.
- O isolado testado é um biotipo de espécie rara ou cuja espécie não está incluída na base de dados do Sistema. Neste caso, arquiva-se o bionúmero gerado no relatório para que o microrganismo possa ser cadastrado no Sistema Vitek após 10 ocorrências com o mesmo número.

Deve ser realizado, também o controle negativo da salina 0,45%-0,50%, utilizada no preparo das suspensões dos microrganismos, através da técnica *spread plate* (0,5mL da salina em TSA).

Incubar durante cinco dias de 30 a 35°C. Descartar a solução salina caso haja crescimento microbiano. Assim com a salina, os cartões também sofrem um controle de qualidade, desta forma verifica-se o desempenho dos cartões a cada novo lote recebido, utilizando-se microrganismos previamente conhecidos.

3 RESULTADOS

Para a análise dos resultados consideraram-se três aspectos: número total de testes onde houve crescimento, microrganismos encontrados e número total de unidades de formadoras de colônias.

3.1 Número total de testes onde houve crescimento

Na Tabela 10 são mostrados os resultados e observa-se que durante os anos de 2004, 2005 e 2006, quando a camiseta não foi utilizada, o percentual de placas onde houve contaminação ficou entre 7 e 9 %.

Tabela 10. Número total de testes onde houve crescimento

	2004		2005		2006		2007	
Mês	Nº de Amostras	Nº de placas contaminadas	Nº de Amostras	Nº de placas contaminadas	Nº de Amostras	Nº de placas contaminadas	Nº de Amostras	Placas contaminadas
Jan	29	5	37	0	36	7	34	1
Fev	51	7	6	0	64	4	36	2
Mar	64	8	85	12	60	7	8	2
Abr	45	3	49	6	38	3	45	4
Mai	75	4	62	4	77	2	35	1
Jun	56	0	63	3	58	5	31	1
Jul	35	4	54	5	39	1	31	1
Ago	62	3	36	9	26	3	29	0
Set	63	5	68	8	59	3	44	0
Out	53	3	50	4	66	4	89	1
Nov	65	3	48	4	43	3	66	5
Dez	39	1	38	1	10	1	74	1
Total	637	46 (7,2%)	596	56 (9,4%)	576	43 (7,3%)	522	19 (3,7%)

Já durante o ano de 2007, quando a camiseta foi utilizada durante todo o período, o percentual de placas contaminadas ficou em torno de 4%.

É importante mencionar que o número de amostragens varia de acordo com o número de vezes que as linhas estudadas encontravam-se em operação. E, neste caso, pode-se observar que, embora o número de amostragens durante 2007 tenha sido menor que nos demais anos, ele representa muito bem a tendência de redução do número de placas contaminadas com o uso da camiseta.

No Gráfico 1 pode ser observado de forma mais clara, a tendência de queda do número de testes com contaminação durante o ano de 2007 em comparação com os demais anos.

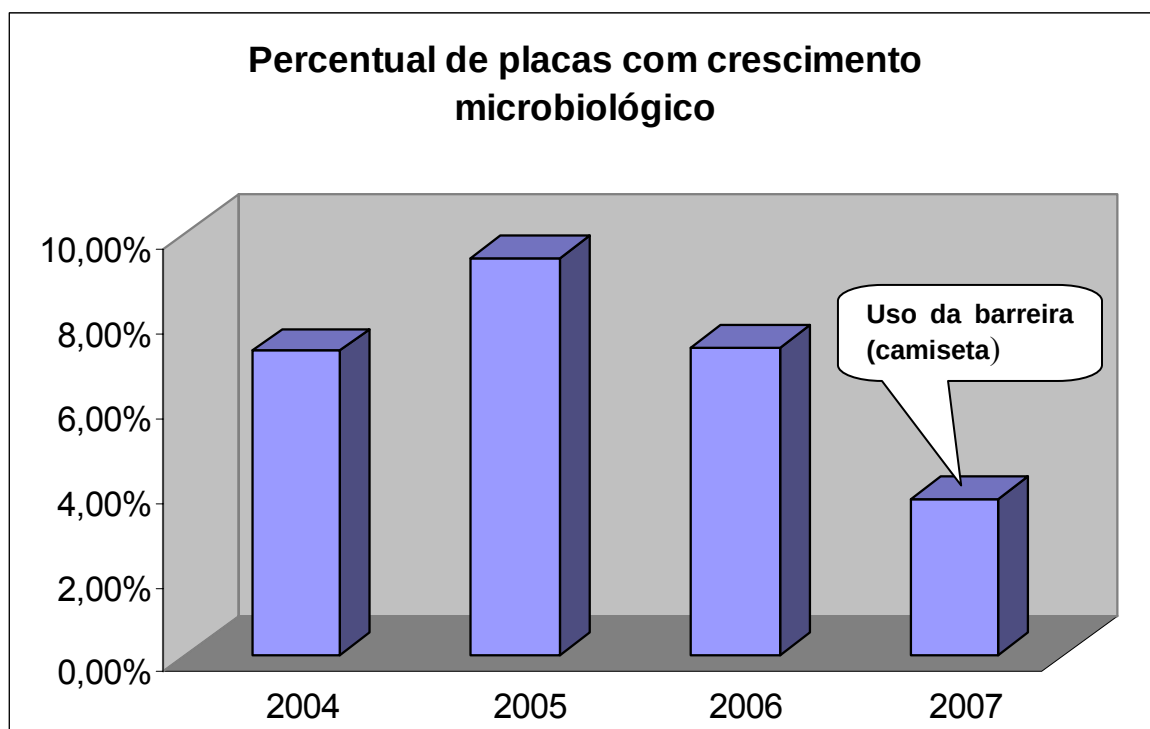


Gráfico 1. Percentual de testes onde ocorreram contaminações.

3.2 Número total de unidades de formadoras de colônias

Nesta análise objetivou-se avaliar o número total de colônias formadas durante nas amostragens, independentemente do número de placas com crescimento. Este dado é muito importante, na medida em que se pode observar que o número de unidades formadoras de colônias foi nitidamente reduzido com o uso da barreira (camiseta), durante as operações, o que pode ser observado na Tabela 11 e no Gráfico 2.

Tabela 11. Número de unidades de formadoras de colônias

Mês	2004		2005		2006		2007	
	NºPlacas	UFC	NºPlacas	UFC	NºPlacas	UFC	NºPlacas	UFC
Jan	29	7	37	0	36	7	34	3
Fev	51	12	6	0	64	4	36	2
Mar	64	27	85	34	60	12	8	3
Abr	45	4	49	7	38	6	45	4
Mai	75	12	62	7	77	2	35	3
Jun	56	0	63	15	58	26	31	1
Jul	35	6	54	5	39	1	31	2
Ago	62	4	36	15	26	3	29	0
Set	63	26	68	17	59	3	44	0
Out	53	12	50	5	66	7	89	1
Nov	65	4	48	6	43	6	66	5
Dez	39	1	38	2	10	1	74	1
Total	637	115 (18,0%)	596	113 (18,9%)	576	78 (13,5%)	522	215 (4,8%)

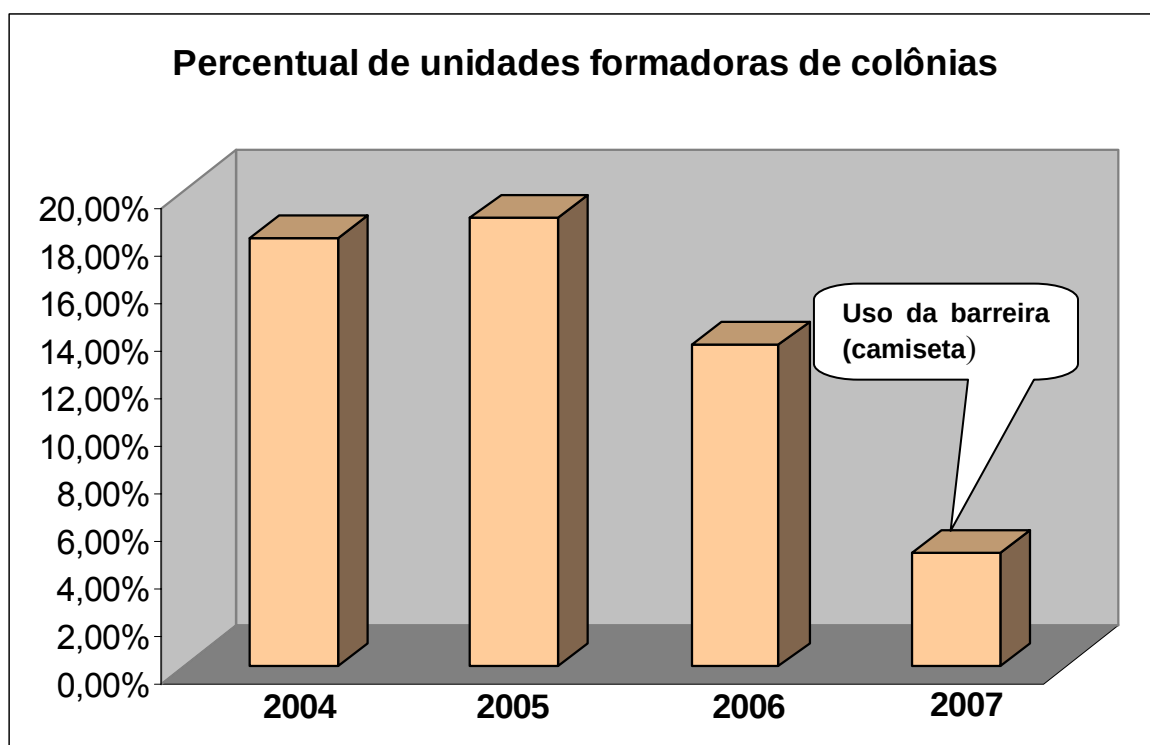


Gráfico 2. Percentual de colônias formadas

Embora o número total de colônias tenha reduzido no ano de 2007, é interessante observar que no ano de 2006, mesmo sem o uso da barreira, o número percentual total de colônias formadas foi significativamente menor quando comparado aos anos de 2004 e 2005. Esta diferença pode ser atribuída às possíveis variações do sistema, uma vez que diversos foram os operadores testados ao longo dos anos estudados. Antes de ingressar nas salas limpas, todos os operadores são obrigados por norma interna, a fazer uma limpeza de todo o corpo, através de um banho com sabonete antisséptico, que reduz significativamente a quantidade de microrganismos em seus corpos. Porém, não se pode afirmar que todos os operadores conseguem a mesma redução de microrganismos com esta medida, pois além do ato de tomar banho ser um processo impossível de ser validado, a quantidade de microrganismos nos corpos dos operadores, varia de uma para outro, e até mesmo, de um dia para outro quando se trata do mesmo operador. De qualquer forma, e com todas essas variáveis, pode-se observar uma tendência de redução do número de colônias formadas com o uso da camiseta.

Embora o que se pretende é que todos os resultados sejam sempre negativos com relação aos monitoramentos microbiológicos, não se consegue eliminar totalmente essas ocorrências, porém o risco de contaminação dos produtos fabricados nas salas analisadas é praticamente nulo, uma vez que de uma forma geral, os produtos contém conservantes que impossibilitam o crescimento de microrganismos e, além disso, a grande maioria sofre um processo de esterilização final por autoclavação após o enchimento, que elimina qualquer forma de vida que possa ter contaminado uma ou mais ampolas.

Além disso, os operadores são treinados sobre como devem se comportar na sala de forma a reduzir ao máximo o risco de que uma partícula viável contamine uma ou mais ampolas. Eles devem fazer movimentos leves ao trabalhar na sala, de forma a evitar turbulências no ambiente e, além disso, sabem que não devem manipular ou se movimentar próximos à zona de enchimento, onde as ampolas estão abertas. Desta forma, mesmo que eventualmente ocorra migração de partículas do corpo para a superfície externa,

com esses cuidados de operação, é muito pouco provável a ocorrência de uma contaminação.

Mesmo com o baixo risco de contaminação mencionado acima nas salas estudadas, toda vez que ocorre uma contaminação acima do limite de alerta, em qualquer monitoramento microbiológico, e não apenas nos controle de superfície, como é o caso da região abdominal, o lote produzido naquele momento, é novamente amostrado e analisado com uma quantidade maior de ampolas.

O Gráfico 3 mostra que houve uma redução em 2007, dos principais contaminantes que são cocos G+ e bacilos G+, porém com relação à presença de fungos e leveduras, no ano de 2005, mesmo sem o uso de barreira, não houve ocorrência desses tipos de microrganismos. De qualquer forma, vale lembrar que a identificação dos microrganismos somente foi efetuada, quando os limites de alerta, já mencionados, foram ultrapassados.

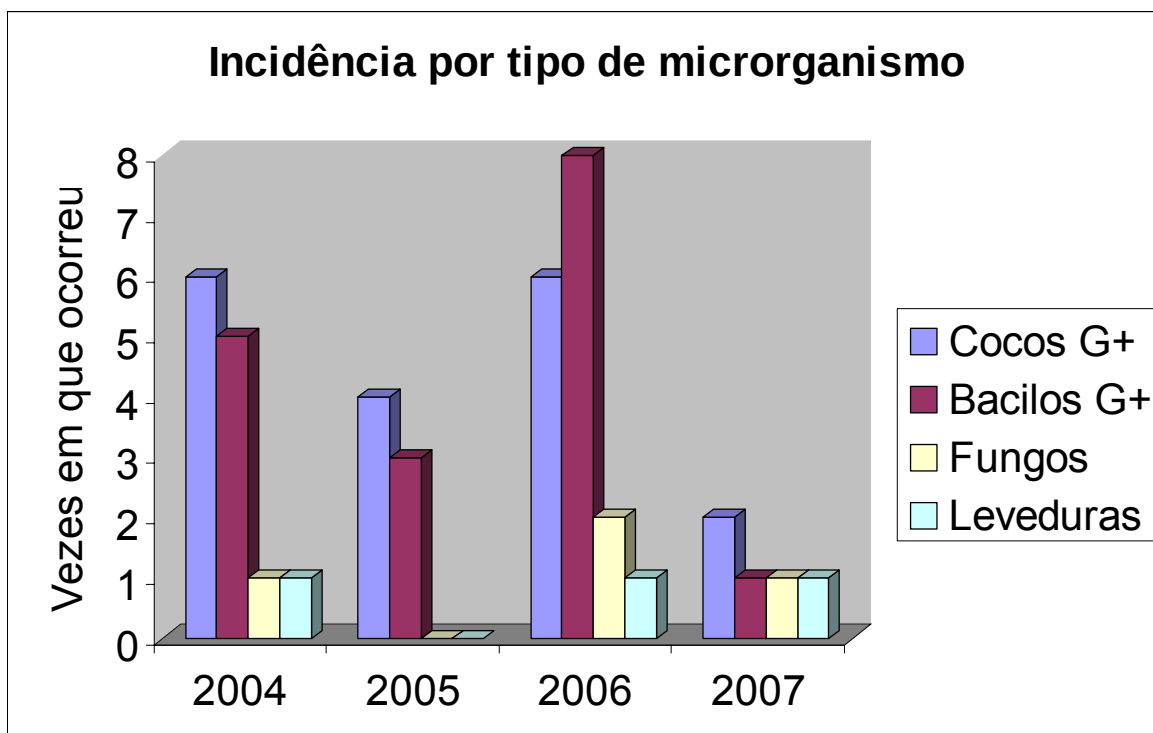


Gráfico 3. Incidência por tipo de microrganismo

3.3 Microrganismos encontrados

Conforme já mencionado anteriormente, as bactérias Gram positivas são os principais habitantes da superfície da pele humana. E neste caso, embora sejam os cocos, a forma mais comumente encontrada, pode haver ocorrência grande também da forma bacilos.

Na Tabela 12 observa-se que a maioria dos microrganismos identificados são os mais comumente encontrados na pele humana, como cocos e bacilos gram positivos. Pode-se observar ainda que eventualmente ocorreu o crescimento de fungos e leveduras, que também podem estar associados à pele. Analisando ainda o Gráfico 3, não se pode afirmar que a barreira foi seletiva, a ponto de reduzir a incidência de uma determinada forma de microrganismo, uma vez que as principais formas, cocos e bacilos gram positivos, cresceram nas amostras de 2007, embora com uma menor incidência.

A seguir estão descritas algumas características dos microrganismos encontrados durante os monitoramentos:

Tabela 12 Microrganismos encontrados

		2004	2005		2006		2007	
Mês	Dia Turno (*)	Microrganismo	Dia Turno	Microrganismo	Dia Turno	Microrganismo	Dia Turno	Microrganismo
Jan					31T	Leveduras (C. laurentii)	23T	Cocos G+ (S.auricularis)
Fev								
Mar	15T	Bacilos G+ Penicillium Cocos G+	22M	Bacilos G+ Cocos G+	11U	Bacilos G+ Cocos G+ (S.sciuri)	28T	Leveduras Cândida famata
	26T	Bacilos G+ Bacilos G+			20T	Cocos G+		
	4M				27M	Bacilos G+		
					30T	Cocos G+		
Abr					3T 6T	Cocos G+ Bacilos G+		
Mai	19M	Bacilos G+ Cocos G+					16T	Cocos G+
Jun			11U 18U	Cocos G+ Cocos G+	12N 23T	Cocos G+ (S.haemolyticus) Bacilos G+ Bacilos G-		
Jul					31T	Micrococos	27T	Bacilos G+ (S. maltophilia)
Ago								
Set	14T	Cocos G+ (S.auricularis) Leveduras			22T	Bacilos G+		
	20T	Cocos G+ (S.captis) Bacilos G+						
	18U	Cocos G+ (S.epidermidis)						
Out	8T	Cocos G+ (S.haemolyticus)			16T	Bacilos G+ (B.megaterium)		
Nov			3M 23T	Bacilos G+ (B.megaterium) Bacilos G+ Cocos G+	14T 16T	Cococs G+ (S.epidermidis) Candiada famata Bacilos G+ (B.megaterium)		
Dez								

(*) Turno: M=manhã, T=tarde, N=noite, U=único

A seguir estão descritas algumas características dos microrganismos encontrados durante os monitoramentos:

3.3.1 Penicillium

Penicillium é um género de fungos que cresce em matéria orgânica morta, como queijos, cereais ou frutas. Várias espécies produzem bactericidas (*antibióticos*) que permitem ao fungo lutar contra a competição feroz das bactérias saprófitas pelo alimento. Na Figura 14 observa-se as características morfológicas deste fungo.

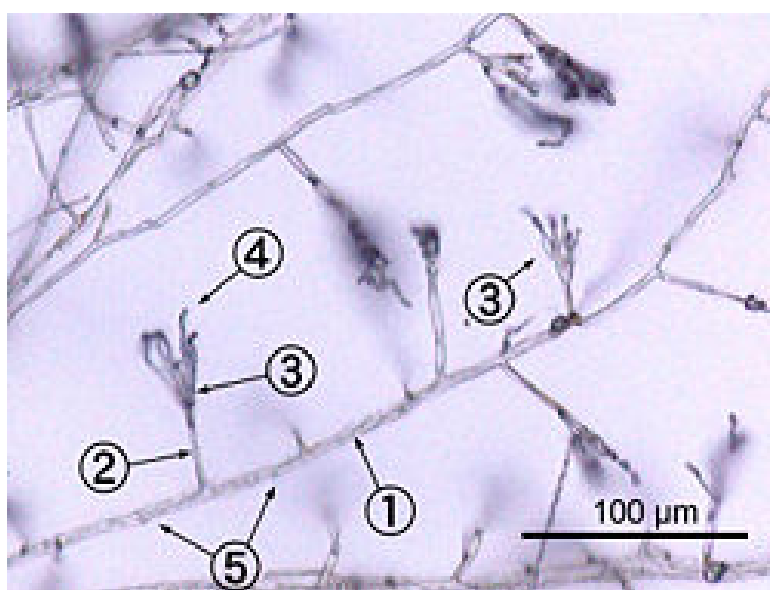


Figura 14. Penicillium sp

3.3.2 Cocos

São células esféricas que, quando agrupadas aos pares, recebem o nome de diplococos. Quando o agrupamento constitui uma cadeia de cocos estes são denominados estreptococos. Cocos em grupos irregulares, lembrando cachos de uva, recebem a designação de estafilococos. Nem sempre foi possível identificar o género e a espécie dos cocos encontrados nos diversos testes, sendo esta forma a que mais ocorreu durante os monitoramentos.

3.3.2.1 Estafilococos

Staphylococcus, segundo a nomenclatura latina internacional, ou em português Estafilococos, são um género de bactérias Gram-positivas, com forma de cocos que causam doenças no ser humano. Os estafilococos são um dos mais comuns patógenos do homem. Eles evoluíram conosco durante muitos milhões de anos e desenvolveram defesas e contra-ataques. O estafilococos têm forma esférica (são cocos), cerca de 1 micrômetro de diâmetro e formam grupos com aspecto de cachos de uvas (*staphylé* é a palavra em grego para cacho de uvas). Após técnica Gram, são roxos ao microscópio óptico, logo Gram-positivos, devido à sua membrana simples e parede celular de peptidoglicano grossa constituída por mureína, ácido teicóico e polissacarídeos. Os estafilococos são anaeróbios facultativos, ou seja, podem viver em meios aeróbios, usando oxigênio, ou anaeróbios através de fermentação, mas crescem muito mais rápido aerobicamente. Não têm flagelo nem cílios logo são incapazes de se mover por si só. A sua temperatura preferida é de 37°C, a mesma do corpo humano. Existem em todo o mundo. Os estafilococos existem na pele de todas as pessoas, geralmente estirpes pouco virulentas (coagulase-negativas), embora frequentemente existam também *Staphylococcus aureus* sem causar doença. Por vezes também existem no intestino e trato urinário. São destruídos por desinfetantes, sabão e altas temperaturas. Resistem bem à desidratação, durante largos períodos. Passam de pessoa para pessoa pelo contacto direto ou com objectos. As feridas e outras aberturas na pele, estados de debilidade, operações cirúrgicas e doenças podem levar a um organismo até então inofensivo se transformar em invasor.

Staphylococcus epidermidis é uma espécie de bactéria, caracterizada por ser coagulase negativa e catalase positiva, conforme apresentado na Figura 15. Trata-se de uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares, através de catéteres, sondas (material de plástico). A espécie não produz toxinas e faz parte da microbiota endógena humana. As infecções causadas por esta espécie são geralmente de origem hospitalar.

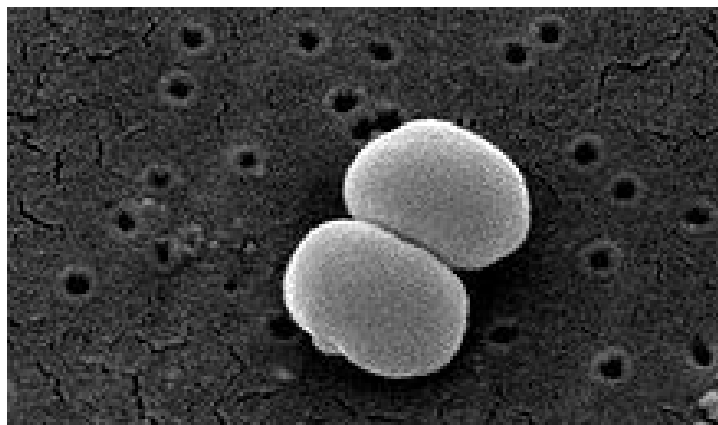


Figura 15. *Staphylococcus epidermidis*.

Staphylococcus haemolyticus é um coco Gram-positivo, coagulase negativo e catalase positivo. É frequentemente encontrado como um organismo comensal em peles de animais e seres humanos.

3.3.3 Bacilos

É a designação comum às bactérias, que possuem forma de bastonetes (Figura 16), sendo em geral patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como é o caso do *Bacillus anthracis*, causador do antraz. O *Bacillus cereus* causa gastroenterites e outras infecções..

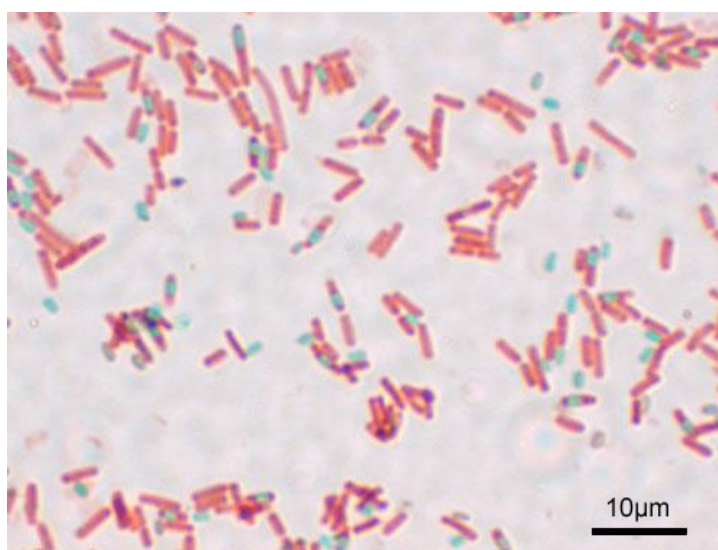


Figura 16. *Bacillus*

Bacillus megaterium (Figura 17) é uma espécie de bactéria em forma de haste e gram-positiva do genero *Bacillus* usada como inoculante de solo na agricultura e horticultura.



Figura 17. *Bacillus megaterium*

3.3.4. Leveduras

As leveduras, representadas na Figura 18, assim como os bolores e cogumelos, são fungos. Apresentam-se caracteristicamente, sob forma unicelular. A etimologia da palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de crescer ou fazer crescer, pois as primeiras leveduras descobertas estavam associadas a processos fermentativos como o de pães e de mostos que provocam um aumento da massa do pão ou do volume do mosto pela liberação de gás e formação de espuma nos mostos.

Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores. São mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume.

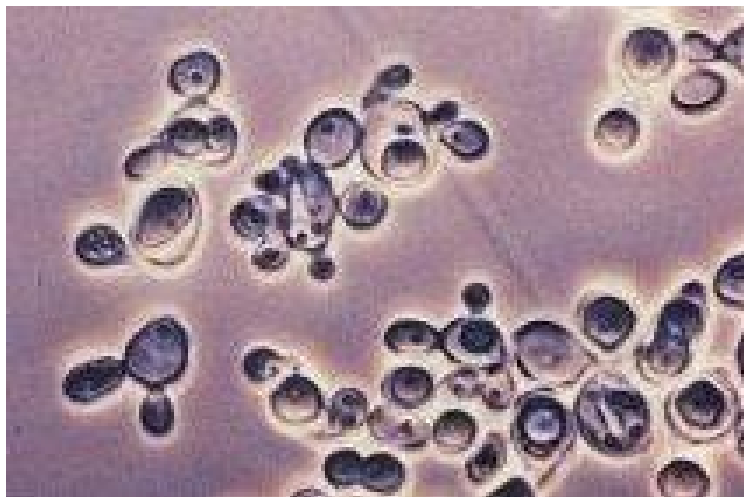


Figura 18. Leveduras

Criptococos laurentii (Figura 19), é uma levedura encapsulada. Foi primeiramente identificada na natureza, em suco de pêssegos, mas a maior incidência deste gênero é em solo contaminado com fezes de pombos e em árvores de eucalipto com a espécie *neoformans*.



Figura 19. *Criptococos laurentii*

Candida famata é uma espécie comum isolada de ambiente, usualmente associada à pele (Figura 20).

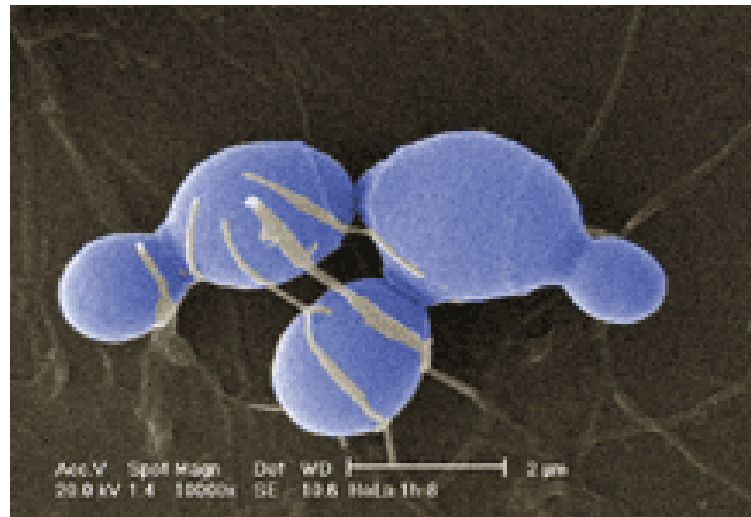


Figura 20. *Candida famata*

Stenotrophomonas maltophilia podem ser encontradas em ambientes aquosos, solo e plantas, incluindo água, urina e secreções respiratórias. É usada para aplicações de biotecnologia.

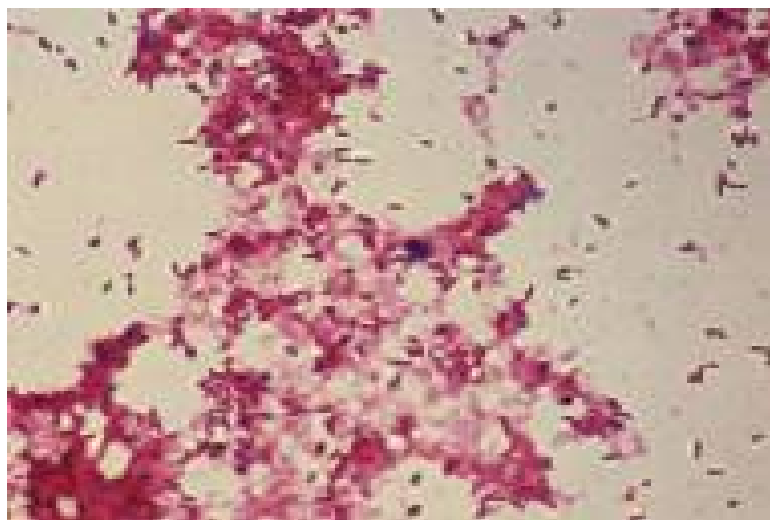


Figura 21. *Stenotrophomonas maltophilia*

4 CONCLUSÃO

O estudo teve como instrumento básico, a análise de partículas em um ambiente *indoor* muito específico, que é o de fabricação de produtos farmacêuticos injetáveis. Foram abordadas especialmente, as partículas oriundas do ar insuflado nessas salas, assim como do corpo das pessoas que nelas trabalham, e que devem ser controladas, de forma a evitar riscos de contaminação e prejuízos à saúde de quem consome esses medicamentos.

Mais especificamente, o estudo ficou restrito às partículas, chamadas biológicas ou bioaerossóis, oriundas do corpo humano, e foi testado o uso de uma camiseta, como barreira à exposição dessas partículas no ambiente da sala de operação.

O uso da camiseta sob o uniforme, não é uma barreira totalmente eficaz, porém, houve redução significativa da incidência de resultados positivos com relação ao número de placas contaminadas.

Nos testes positivos encontrados durante os anos de 2004, 2005 e 2006, ocorreram valores percentuais de contaminação na faixa de 7 a 9 %, ao passo que no ano de 2007 esses valores caíram para cerca de 4%, obtendo-se uma redução de cerca de 50%.

A barreira não foi seletiva, ou seja, não eliminou a passagem de um ou outro microrganismo, uma vez que os microorganismos que tiveram maior incidência; cocos e bacilos gram positivos, também foram identificados nos testes com o uso da mesma.

Com relação à análise do número total de colônias formadas, percebe-se também uma redução relativa destas com o uso da barreira, quando comparadas aos anos de 2004, 2005 e 2006 com o ano de 2007.

Na aplicação da camiseta como barreira, não há retorno mensurável, uma vez que não existe relação direta de seu uso com aumento de produtividade, ou redução de número de unidades de produção refugadas. O que se pode afirmar é que existe uma redução do risco de contaminação dos produtos envolvidos, com a redução dos níveis de contaminação percebidos durante o monitoramento.

O uso desta barreira é recomendado para todos aqueles que desejam

reduzir riscos de contaminação deste tipo de ambiente, com conseqüente redução do risco de contaminação dos produtos envolvidos.

Embora o uso proposto da camiseta não elimine a presença de microrganismos, nos monitoramentos ambientais da sala de fabricação de produtos estéreis, mais especificamente na região abdominal dos operadores, o mesmo reduz significativamente a probabilidade de ocorrência de contaminação, evitando à migração de partículas viáveis (microrganismos) da pele para o meio operacional através do tecido do uniforme.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOS, Gustavo dos Santos, Análise de Salas Limpas. Acesso em novembro 2007. Disponível em http://143.54.70.55/pss/diploct/Gustavo_Aidos_B.pdf cve.

AKAMINE, Dirce, Normalização de vestuário em áreas limpas , Riopharma, setembro 2007 . Acesso em novembro 2007. Disponível em <http://74.125.45.132/search?q=cache:-77W4ivHgUJ:www.metodoeventosrio.com/riopharma/apresentacoes/SalaG/Sexta/13%252030%2520dirce%2520akamine%2520Riopharma%25202007.ppt+fontes+de+contamina%C3%A7%C3%A3o+em+salas+limpas&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br.>

BELEW, Bill, Selecting Particle Counters for ISO 14644 Certification of Cleanrooms - Semiconductor International. Acesso em novembro 2007. Disponível em: <http://www.pmeasuring.com/support/papers/particlemonitoring/air/app60/viewHtml>

BIER, Otto. Microbiologia e Imunologia.30ª Edição. Editora Melhoramentos. São Paulo; 1990.

BOOTH, Anne , Environmental Monitoring Practices and Regulations for the Sterile Manufacturer-Global Society For Contamination Control. Acesso[acesso em 11 Nov 2006. Disponível em: http://www.gsfcc.org/Resource/Paper_ID_225.pdf

BUDDEMEYER, Julie, Selecting and Active Air Sampling Methodology Controlled Enviroments Magazine Acesso em Nov 2006. Disponível em:<http://www.cemaq.us/articles.asp?pid=537>

EC guide to good manufacturing practice , revision to annex 1. Acesso em 22 Nov 2006. Disponível em http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-4/pdfs-en/revan1vol4_3.pdf

ENVIRCO. Acesso em novembro 2007. Disponível em <http://www.envirco.com/faq.asp>)

Guidance for Industry - Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing , Current Good Manufacturing. Acessado em novembro 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070342.pdf>

Guidelines on test methods for environmental monitoring for aseptic dispensing facilities. Acessado em novembro 2006. Disponível em: <http://www.astcp.scot.nhs.uk/QASIG/environmental%20monitoring.pdf>

JAISINGHANI, Rajan A - Bactericidal Technology for Clean Rooms and Indoor Air Quality Applications Acessado em novembro 06. Disponível em: http://www.cleanroomsys.com/downloads/docs/A2C2%20_98biocidal.pdf

KELLY,Jason, Pharmaceutical Industry Cleanroom Monitoring - Viable and Non-Viable Particle Detection - Controlled Environments Magazine Acessado em novembro 2006. Disponível em: <http://www.cemag.us/articles.asp?pid=493>

Kochevar ,Steven D - Guia básico para a tecnologia de partículas Acessado em outubro 2007 Disponível em <http://www.pmeasuring.com/br/support/papers/particlemonitoring/gas/basicguide/viewHtml>

KRUPKA, N.; Escherich, K.; Habermann,M.; Harries,K; Matheisen,A; Petersen, B. - Quality Control Update the cleanroom for superconducting Multi Cell Cavities at DESY . Acessado em novembro 2006. Disponível em http://w4.lns.cornell.edu/public/SRF2005/posters/thursday/ThP13_poster_srf2005.pdf

MCDONNEL,Gerald , Large area decontamination Acessado em novembro 2007 . Disponível em <http://www.cleanroom-technology.co.uk/story.asp?storyCode=26721>

NEW WAYZ CONSULTING LIMITED, Classification of Clean Rooms. Acesso em novembro 2006. Disponível em <http://www.newwayz.co.nz/refmaterial/airclasses.pdf>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC 210, de 4 de agosto de 2003 . Acessado em novembro 2006.Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/Legis/index.htm>

SARTAIN, Elaine Kopis - Controlled Environments Magazine , regulatory Focus. Acessado em novembro 2006 .Disponível em:<http://www.cemag.us/articles.asp?pid=450>

SHEARER, Gretchen L, Contaminant Identification in Pharmaceutical Products , 2003 .Acessado em 25 Nov 2006] Disponível em: <http://www.modernmicroscopy.com/main.asp?article=18&page=2>

TARGA, Ana Maria, Vestimentas para sala limpa: abordagem geral - Revista Fármacos & Medicamentos, São Paulo , v. 7, n. 40 , p. 49-52, Maio./Jun. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS , Acesso em novembro 2006. Disponível em:http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf

ZHANG, John , Understanding Pharmaceutical Cleanroom Design –, American Society of Heating, Refrigerating and Air conditioning engineers, Inc .Acesso em novembro 2006. Disponível em: <http://www.ashe.org/ashe/codes/epa/pdfs/JournalSept2004PharmacyDesign.pdf>

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)