

Luciana Veloso da Costa

**Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água  
purificada dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos –  
Fiocruz**

Rio de Janeiro

2014

Luciana Veloso da Costa

**Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada  
dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos – Fiocruz**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Antonieta Ferrara

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Érica Louro da Fonseca

Rio de Janeiro

2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

C837a

Costa, Luciana Veloso da

Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos - Fiocruz / Luciana Veloso da Costa. – Rio de Janeiro, 2014.

xii, 88. : il. 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Antonieta Ferrara

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Érica Louro da Fonseca

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2014.

Bibliografia: f. 76-80

1. Água purificada. 2. Controle microbiológico. 3. Delftia acidovorans . 4. Indústria farmacêutica. 5 MALDI-TOF MS

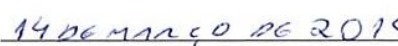
I. Título.

CDD 658.562

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura



Data

Luciana Veloso da Costa

**Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada  
dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos – Fiocruz**

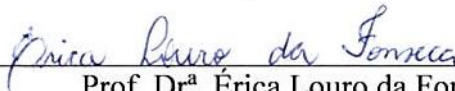
Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2014.

Banca Examinadora:



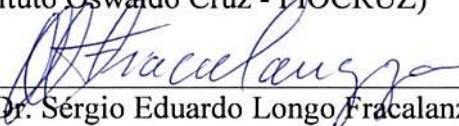
Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonieta Ferrara  
(Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ)



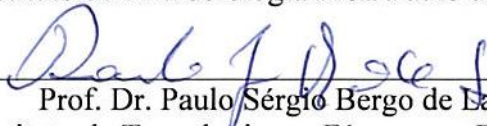
Prof. Dr<sup>a</sup>. Érica Louro da Fonseca  
(Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - FIOCRUZ)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Viana Vieira  
(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)



Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza  
(Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bergo de Lacerda  
(Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus benfeitores pela ajuda, sustentação e apoio nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus pais, George e Josely e ao meu noivo, Ed, por me apoiarem, por entenderem as minhas ausências e o todo o nervosismo. Agradeço a vocês por nunca desistirem de mim e me estimularem a continuar. Amo muito vocês!

Às minhas orientadoras, Antonieta e Érica, por toda a ajuda, pelas sugestões, por terem me acalmado, nos momentos de angústia, pela paciência e dedicação.

A Luciane Medeiros por ter me incentivado e ajudado, quando mal me conhecia e ter me direcionado neste estudo. Agradeço por toda a ajuda na identificação das cepas e pela paciência. Muito obrigada de coração!

A Fernanda Ventura pela generosidade e boa vontade, nos momentos que mais precisei.

Aos colegas do Laboratório de Controle Microbiológico de Farmanguinhos, Jorginho, Zezé, Carlinha e Patrícia, pela ajuda, apoio, suporte e compreensão.

Aos colegas de Farmanguinhos, Paulo, Adão e Ivaneide pela boa vontade, pelas explicações e dicas sobre o sistema de água. Vocês me ajudaram muito!

Aos amigos de turma do mestrado, pois sem eles tudo teria sido muito mais difícil. Reencontrei nesta turma amigos de longa data. Agradeço em especial a Ester, Aline, Juliana e Marcus, amigos sempre presentes, pela confiança, pelo apoio e estímulo, pela paciência de me ouvirem, nos momentos de desabafo e por se mostrarem sempre solícitos. Comemoraremos juntos, em breve!

À amiga de Farmanguinhos, Dayse, pela amizade, confiança e por ter me ouvido e apoiado, inúmeras vezes.

Às secretárias do ensino de Farmanguinhos, Ariane e Beth, por toda a ajuda, pela boa vontade, por se mostrarem sempre solícitas e nos acalmarem, nos momentos de dificuldade.

Aos professores do mestrado, pelo suporte e pelos esclarecimentos fornecidos. Agradeço em especial aos professores Wanise Barroso e Fernando Medina, que transcenderam o papel de professores, tornando-se amigos e sinceros incentivadores de toda a turma. Vocês são um exemplo para mim, pelo caráter e pela simplicidade, demonstrando que o mais importante não é o título obtido, mas sim a maneira como procedemos com os outros e as nossas atitudes diante das diversas situações da vida. Vocês são verdadeiros educadores!

## RESUMO

COSTA, Luciana Veloso. *Avaliação da diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada dedicado à produção de penicilínicos em Farmanguinhos – Fiocruz*. 2014. 88f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz, representa o maior laboratório farmacêutico oficial vinculado ao Ministério da Saúde brasileiro responsável pela produção de mais de um bilhão de medicamentos por ano. As legislações sanitárias vigentes definem que devem ser utilizadas instalações segregadas e dedicadas para a produção de medicamentos, como penicilinas, minimizando os riscos de contaminação cruzada, que conseqüentemente possam gerar danos à saúde. Por isso, Farmanguinhos possui, atualmente, uma área dedicada à produção de amoxicilina, assim como o sistema gerador de água purificada, que atende à referida fabricação, também é dedicado à mesma. A água é a matéria-prima de mais elevado volume empregada na produção farmacêutica, exercendo profundo impacto na qualidade do produto e na segurança do paciente. O controle microbiológico da qualidade da água utilizada em processos farmacêuticos torna-se fundamental, já que micro-organismos podem sobreviver e proliferar em sistemas de água, tornando-se fontes de contaminação microbiana e pirogênica. A identificação destes micro-organismos e as informações obtidas sobre os mesmos podem ser extremamente úteis na identificação da fonte de contaminação microbiana de um produto ou processo, além de direcionar ações corretivas, se necessário. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada, dedicado à produção de penicilínicos, de Farmanguinhos. Para isto, as amostras de água coletadas a partir do ponto de entrada, ponto de água potável, e do ponto de saída do sistema, ponto de água purificada, foram analisadas microbiologicamente quanto à contagem de micro-organismos mesófilos e quanto à presença de patógenos: *Escherichia coli*; coliformes totais e *Pseudomonas aeruginosa*. As amostras foram analisadas entre janeiro e maio de 2013. Todas as colônias obtidas foram isoladas e submetidas à identificação, através de equipamento MALDI-TOF. Não foram observados resultados acima da especificação para ambos os pontos, no período analisado. Do ponto de água potável foram isoladas apenas três espécies bacterianas: *Bacillus cereus*, *Delftia acidovorans* e *Acinetobacter sp*. Uma diversidade microbiana maior foi isolada a partir do ponto de água purificada, como: *Burkholderia sp*, *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas oryzae* e *Pseudomonas putida*. A espécie *Delftia acidovorans*, associada a fenômenos de biocorrosão foi o micro-organismo mais encontrado, sendo identificado em cerca de 1/3 do total de isolados. O sistema de água de Farmanguinhos é sanitizado mensalmente com sanitizante à base de glutaraldeído. Pode-se concluir que a sanitização está sendo eficiente para manter a contagem total de micro-organismos mesófilos dentro dos limites especificados. No entanto, algumas ações podem ser tomadas para evitar a presença de biofilmes, o que aprimorará ainda mais a qualidade da água purificada gerada.

Palavras-chave: Água Purificada. Controle Microbiológico. *Delftia acidovorans*. Indústria Farmacêutica. MALDI-TOF MS.

## ABSTRACT

Assessment of microbial diversity of the purified water generating system dedicated to penicillin production in Farmaguinhos – Fiocruz.

The Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmaguinhos), technical- scientific unit of Fundação Oswaldo Cruz, is the largest official pharmaceutical laboratory under the Brazilian Ministry of Health responsible for producing more than one billion drugs per year. The current sanitary laws define that segregated facilities must be dedicated and used for the production of drugs such as penicillin, thus the risk of serious damage to health, due to cross-contamination, can be minimized. Because of this, Farmanguinhos has a dedicated production of amoxicillin, as well as a purified water generator system that caters to such manufacturing, is also dedicated to this area. Water is the raw material of the highest volume used in pharmaceutical production so that it has a profound impact on the product quality and patient safety. Therefore, the microbiological quality control of water used in pharmaceutical processes becomes crucial, since microorganisms can survive and proliferate in water systems, becoming sources of microbial and pyrogenic contamination. The identification of these microorganisms and the information obtained about them can be extremely useful in identifying the source of microbial contamination of a product or process, in addition to direct corrective actions, if necessary. The objective of this study was to evaluate the microbial diversity present in the purified water generator system, dedicated to the area of manufacturing penicillin-based drugs of Farmanguinhos. To aim this objective, water samples collected from the entry point of the system, point of drinking water, and the point of departure, point of purified water, were analyzed microbiologically for the count of mesophilic and for the presence of pathogens: *Escherichia coli*; coliforms and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. The samples were analyzed between January and May of 2013. All colonies obtained were isolated and subjected to identification by MALDI - TOF equipment. No results above specification for both points were observed in the analyzed period. From the point of drinking water only three bacterial species were isolated: *Bacillus cereus*, *Acinetobacter* sp and *Delftia acidovorans*. A higher microbial diversity was observed from the purified water source, such as *Burkholderia* sp, *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas oryzae*. The species *Delftia acidovorans* associated with biocorrosion phenomena was the microorganism most frequently found and was identified in about 1/3 of the total isolates. The water system of Farmaguinhos water is sanitized monthly with sanitizing agent comprising glutaraldehyde. It can be concluded that sanitization is being effective to maintain the total count of mesophilic within the specified limits. However, some actions can be taken to avoid the presence of biofilms, which will improve even more the quality of purified water generated.

Keywords: Purified Water. Microbiological Control. *Delftia acidovorans*. Pharmaceutical Industry. MALDI-TOF MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagem do Complexo Tecnológico de Medicamentos – Farmanguinhos, localizado em Jacarepaguá.....	16
Figura 2 –	Primeira parte do sistema de geração de água purificada do prédio 40.....	19
Figura 3 –	Segunda parte do sistema de geração de água purificada do prédio 40...	20
Figura 4 –	Micrografia eletrônica de uma película de biofilme produzida por <i>Salmonella enteritidis</i> em uma interface líquido-ar do meio Luria-Bertani, após 3 dias de incubação a temperatura ambiente.....	24
Figura 5 –	Desenvolvimento do biofilme.....	25
Figura 6 –	Imagens demonstrativas do método de Contagem em placa.....	38
Figura 7 –	Imagens demonstrativas do aparato utilizado no método de Filtração por membrana.....	40
Figura 8 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em janeiro de 2013.....	54
Figura 9 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em janeiro de 2013.....	55
Figura 10 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em fevereiro de 2013.....	55
Figura 11 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em fevereiro de 2013.....	56
Figura 12 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em março de 2013.....	56
Figura 13 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em março de 2013.....	57
Figura 14 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em abril de 2013.....	57
Figura 15 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em abril de 2013.....	58
Figura 16 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em maio de 2013.....	58



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 17 –	Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em maio de 2013.....	59
Figura 18 –	Porcentagem de identificação das cepas isoladas do sistema de água de Farmanguinhos.....	61
Figura 19 –	Porcentagem de identificação das cepas isoladas do ponto SSP40N.....	61
Figura 20 –	Porcentagem de identificação das cepas isoladas do ponto GKP40N.....	62
Figura 21 –	Cepas identificadas a partir do ponto SSP40N e as respectivas frequências de isolamento.....	62
Figura 22 –	Cepas identificadas a partir do ponto GKP40N e as respectivas frequências de isolamento.....	63
Figura 23 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Bacillus cereus</i> .....	84
Figura 24 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Acinetobacter</i> sp.....	84
Figura 25 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Delftia acidovorans</i> .....	85
Figura 26 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Staphylococcus warneri</i> .....	85
Figura 27 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	86
Figura 28 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Pseudomonas</i> sp.....	86
Figura 29 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	87
Figura 30 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Pseudomonas putida</i> .....	87
Figura 31 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> .....	88
Figura 32 –	Colônia em placa contando ágar TSA da espécie bacteriana <i>Burkholderia</i> sp.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes microbiológicos exigidos para os tipos de água mais utilizados na Indústria Farmacêutica e limites.....	34
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Água para Injetáveis
AP	Água Purificada
ATP	Adenosina Trifosfato
AUP	Água Ultrapurificada
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CMI	Corrosão Microbiologicamente Induzida
CTM	Complexo Tecnológico de Medicamentos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i>
Farmanguinhos	Instituto de Tecnologia em Fármacos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLC	<i>Programmable Logic Controller</i> - Programador Lógico Programável

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	Ágar Caseína Soja
TSB	Caldo Caseína Soja
TOC	Carbono Orgânico Total
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UE	Unidades de Endotoxinas
VNC	Viáveis mas não Cultiváveis
VRB	Violeta Vermelho Neutro Bile

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
1.1	<b>Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos)</b> .....	15
1.1.1	<u>O sistema de purificação de água de Farmanguinhos</u> .....	17
1.2	<b>Diversidade microbiana em sistemas de água</b> .....	22
1.3	<b>Biofilmes</b> .....	23
1.4	<b>Monitoramento microbiológico de água</b> .....	27
1.5	<b>A água na Indústria Farmacêutica</b> .....	29
1.5.1	<u>Água potável</u> .....	31
1.5.2	<u>Água purificada</u> .....	32
1.5.3	<u>Água ultrapurificada</u> .....	33
1.5.4	<u>Água para injetáveis</u> .....	33
1.6	<b>Métodos de análise microbiológica</b> .....	35
1.6.1	<u>Contagem do número total de micro-organismos mesófilos</u> .....	37
1.6.1.1	Contagem em placa.....	38
1.6.1.2	Filtração por membrana.....	39
1.6.1.3	Número mais provável.....	40
1.6.2	<u>Pesquisa de patógenos</u> .....	41
1.6.3	<u>Identificação microbiana</u> .....	42
1.6.3.1	Métodos fenotípicos.....	43
1.6.3.2	Métodos genotípicos.....	45
1.7	<b>Preservação de micro-organismos</b> .....	45
1.8	<b>Justificativa</b> .....	47
2	<b>OBJETIVO</b> .....	48
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	48
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	48
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
3.1	<b>Análise microbiológica da água</b> .....	49
3.1.1	<u>Contagem do número total de micro-organismos mesófilos</u> .....	49
3.1.2	<u>Pesquisa de patógenos</u> .....	50
3.2	<b>Obtenção, isolamento e congelamento das cepas microbianas</b> .....	51

## SUMÁRIO

3.3	<b>Identificação das cepas.....</b>	52
3.4	<b>Criação da bacterioteca de Farmanguinhos.....</b>	53
4	<b>RESULTADOS.....</b>	54
4.1	<b>Análise microbiológica dos pontos de água potável e purificada.....</b>	54
4.2	<b>Cepas isoladas e identificadas a partir dos pontos de água potável e purificada.....</b>	60
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	65
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	76
	<b>ANEXO 1.....</b>	81
	<b>ANEXO 2.....</b>	84

## INTRODUÇÃO

O Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), é o maior laboratório farmacêutico oficial vinculado ao Ministério da Saúde. Farmanguinhos é responsável pela produção de mais de um bilhão de medicamentos por ano, visando ao atendimento dos programas estratégicos do Governo Federal. O Instituto disponibiliza antibióticos, anti-inflamatórios, anti-infecciosos, antiulcerantes, analgésicos, medicamentos para doenças endêmicas, como malária e tuberculose, antirretrovirais contra a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), medicamentos para o sistema cardiovascular e o sistema nervoso central e para os programas de diabetes e hipertensão. Estes medicamentos são distribuídos à população pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e atendem também a demandas emergenciais no Brasil e no exterior (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ, 2009).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 17 de 2010 define que devem ser utilizadas instalações segregadas e dedicadas para a produção de determinados medicamentos, como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e demais derivados beta-lactâmicos, para que o risco de danos graves à saúde, em função de contaminação cruzada, possa ser minimizado (BRASIL, 2010). Portanto, em conformidade com as exigências regulatórias nacionais, Farmanguinhos possui, atualmente, uma área dedicada à produção de amoxicilina. Do mesmo modo, o sistema gerador de água purificada, que atende à referida fabricação, também é dedicado à mesma.

A água é a matéria-prima de mais elevado volume empregada na produção farmacêutica e, por isso, exerce profundo impacto na qualidade do produto e na segurança do paciente. Mesmo nas formas purificadas de água, produzidas em sistemas bem planejados, problemas podem ocorrer, os quais derivam, muitas vezes, da consideração equivocada de que a água, na sua forma pura, é inerte e estável. No entanto, a água consiste em meio de crescimento que, apesar de pobre em nutrientes, apresenta variações em suas características microbianas (PINTO et al., 2010).

Em uma indústria farmacêutica, a gama de aplicações da água abrange desde a formulação do produto e preparo de reagentes, ao uso como agente extrator, de limpeza, como meio de troca térmica, insumo para água altamente purificada, para vapor, etc (PINTO et al., 2010).

A água purificada é um importante componente de muitos ambientes produtivos, por isso a investigação de sua diversidade microbiana tem atingido importância global (BOHUS et al., 2010).

Ecosistemas aquáticos oligotróficos, tanto naturais quanto industriais, são ambientes extremos. Como parte de sua adaptação, os micro-organismos tendem a formar biofilmes em diferentes superfícies. Nestes biofilmes, os nutrientes estão mais disponíveis, o que permite que os micro-organismos persistam em um ambiente pobre em nutrientes. A formação de biofilmes e a atividade metabólica dos micro-organismos podem causar a bioincrustação e, conseqüentemente, a corrosão de metais ou outras superfícies (BOHUS et al., 2010).

O controle microbiológico da qualidade da água utilizada em processos farmacêuticos, portanto, torna-se fundamental, já que micro-organismos podem sobreviver e proliferar em sistemas de água, tornando-se, assim, fontes de contaminação microbiana e pirogênica, além de favorecerem processos de corrosão de metais presentes em sistemas de purificação de água. A identificação destes micro-organismos constitui um fator relevante por serem agentes potencialmente prejudiciais para os produtos, processos e equipamentos nos quais a água é utilizada. As informações obtidas sobre estes micro-organismos podem ainda ser extremamente úteis na orientação sobre as possíveis fontes de contaminação microbiana de um produto ou processo (KAWAI et al., 2002, SAN et al., 2012 e SULLIVAN, et al., 2010).



## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos)

O Instituto de Tecnologia em Fármacos foi fundado em 1956, com a criação do Serviço de Medicamentos Oficiais. O Instituto era uma autarquia do então Ministério da Educação e Saúde e visava ao combate das endemias rurais. Vinte anos mais tarde, foi ampliado e definitivamente integrado à Fiocruz (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Até o final da década de 80, Farmanguinhos produzia quase exclusivamente sulfato ferroso, produto de fabricação simples e baixo valor agregado, o qual era distribuído a gestantes e crianças, pelo Ministério da Saúde. Na década de 90, o governo federal investiu na Unidade, de forma a alterar a sua linha de produção, para privilegiar medicamentos de maior densidade tecnológica. Conseqüentemente, em 1999, Farmanguinhos foi convidado a participar do desenvolvimento de fármacos para o programa brasileiro contra a AIDS. Este trabalho fortaleceu o Ministério da Saúde nas negociações com empresas detentoras de patentes de medicamentos e gerou uma diminuição significativa no custo dos medicamentos para o Brasil, o que tornou o programa anti-AIDS brasileiro uma referência mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Com a superação de expectativas e demandas, Farmanguinhos tornou-se um dos mais importantes laboratórios oficiais, exercendo papel de destaque na pesquisa e no desenvolvimento de medicamentos essenciais e garantindo o acesso da população a estes medicamentos. A Unidade tem como meta ser um centro de referência em pesquisa, tecnologia e produção de medicamentos. Para atingir essa meta, Farmanguinhos estabeleceu como estratégia a promoção de parcerias com os setores público e privado para a produção de fármacos oriundos de plantas ou síntese química e para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Além disso, o Instituto possui acordos de transferência de tecnologia com a Índia e países da Europa e da África (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ, 2009).

Farmanguinhos pesquisa e produz medicamentos de que necessita a população, com ênfase principal no atendimento à população mais carente. Para isso, a Unidade busca atender ao tratamento de doenças endêmicas, as quais os grandes laboratórios privados, habitualmente, excluem da sua linha industrial, por considerarem baixo o retorno financeiro que as mesmas proporcionariam, apesar do alto risco e elevada virulência das referidas

doenças. Dentre elas, podemos citar: tuberculose, malária, doença de Chagas, leishmaniose e esquistossomose, além das moléstias derivadas diretamente da miséria e da ignorância, como anemias, verminoses e outras parasitoses. Farmanguinhos também produz vários dos medicamentos prescritos no coquetel contra o HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Desde 1997, a lista de medicamentos para a área de saúde pública tem sido ampliada, visando combater também outros males, como hipertensão, diabetes e distúrbios psiquiátricos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Com o objetivo de atender à demanda crescente da Unidade, em 2003, o Ministério da Saúde adquiriu para a Fiocruz/Farmanguinhos uma nova fábrica, em Jacarepaguá (Figura 1). A incorporação representou para o Instituto um crescimento substancial de sua área fabril, que passou de 7.000 m<sup>2</sup> no campus de Manguinhos para 48.000 m<sup>2</sup> de área construída em um terreno com cerca de 100.000 m<sup>2</sup>. Esta nova unidade fabril, denominada Complexo Tecnológico de Medicamentos (CTM), está capacitada a produzir até 6 bilhões de unidades farmacêuticas por ano, com áreas dedicadas à produção de formas farmacêuticas sólidas, semi-sólidas e líquidas (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ, 2009).



**Figura 1:** Imagem do Complexo Tecnológico de Medicamentos – Farmanguinhos, localizado em Jacarepaguá. Fonte: [http://fc01.deviantart.net/fs51/f/2009/317/5/4/Teste\\_HDR\\_Farmanguinhos\\_CTM\\_by\\_deivison.jpg](http://fc01.deviantart.net/fs51/f/2009/317/5/4/Teste_HDR_Farmanguinhos_CTM_by_deivison.jpg). Acesso em 28/02/2013.

Em 2006, Farmanguinhos ampliou, ainda mais, suas atividades industriais. A Unidade formalizou acordo de produção de amoxicilina em comprimidos de 875 mg, para a *GlaxoSmithKline* (GSK). O medicamento de referência é denominado Amoxil BD. Pela primeira vez, o Instituto se propôs a prestar serviços como local de fabricação para terceiros e o planejamento é de que, no futuro, o medicamento seja fabricado em Farmanguinhos, com a sua própria marca, já que o referido antibiótico é um dos produtos da lista que compõe o programa Farmácia Popular do Brasil, da área de Assistência Farmacêutica do SUS (LUIS NASSIF ONLINE, 2013).

Atualmente, documentos regulatórios nacionais e internacionais determinam a necessidade de áreas dedicadas à fabricação de alguns produtos, como medicamentos à base de penicilina, para evitar o risco de contaminação cruzada e, conseqüentemente, danos graves à qualidade do produto e, principalmente, à segurança do paciente (BRASIL, 2010 e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Para atender a esta exigência e ao compromisso de fabricação de amoxicilina em uma área destinada exclusivamente à produção de fármacos à base de penicilina foi disponibilizada no CTM. Em 2011, obteve-se a primeira certificação em Boas Práticas de Fabricação (BPF) para esta área, com um sistema de geração de água purificada totalmente dedicado à mesma (LUIS NASSIF ONLINE, 2013 e INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS, 2013).

#### 1.1.1 O sistema de purificação de água de Farmanguinhos

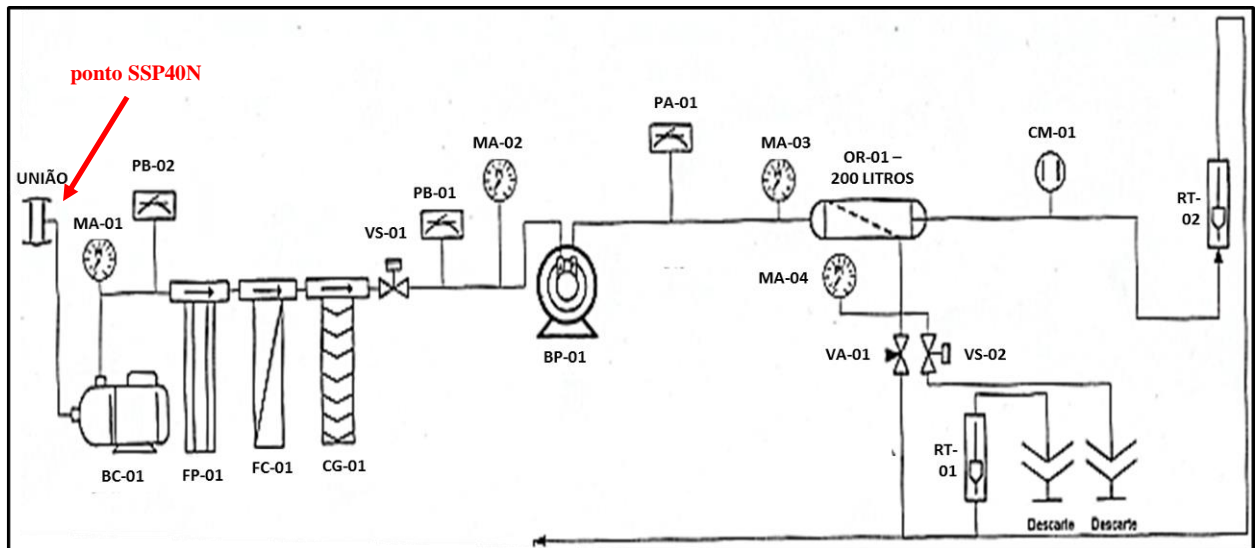
O Sistema para produção, armazenamento e distribuição de água purificada para o prédio 40 de Farmanguinhos, área dedicada à produção de medicamentos à base de penicilina, foi desenvolvido e fornecido pela empresa GEHAKA, de modo a atender aos seguintes requerimentos (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2011):

- RDC nº 17 de abril de 2010 (BRASIL).
- UNITED STATES PHARMACOPEIA 32 NF 27.
- *Guide to Inspection of High Purity Water Systems* – FDA (*Food and Drug Administration*) 1993.
- *Bioprocessing Equipments* – ASME BPE 2009.

- ISPE – *Pharmaceutical Engineering Guide – Water and Steam Systems* – Janeiro de 2001.
- *Code of Federal Regulations* 21 CFR – Partes 11, 210 e 211.
- Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

A água que alimenta o sistema de geração de água purificada é fornecida por Farmanguinhos, com qualidade de água potável. Toda a tubulação do sistema de água é composta por prolipropileno. A água purificada é gerada em uma vazão aproximada de 500 L/h por um equipamento de osmose reversa de passo simples, após passar através da seguinte sequência de tratamento (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012), conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3:

- Bomba de Entrada (BC-01).
- Filtro de Partículas (FP-01).
- Filtro de *Carbon Block* (FC-01).
- Filtro de Carvão Ativado Granulado (CG-01).
- Bomba de Alta Pressão (BP-01).
- Membrana de Osmose Reversa (OR-01).
- Bomba de Recirculação Interna (BC-02).
- Filtros de Resina Deionisadora (FD-01 e FD-02).
- Lâmpada de irradiação Ultravioleta (UVG-01) de comprimento de onda de 254 nm, para redução da carga microbiana.
- Cápsulas de Ultrafiltração (UF-01 e UF-02).
- Sistema de recirculação em Anel de Distribuição (AISI 316 L – 20 m), com bomba (BC-02) controlada por um variador de frequência e manômetro (MA-05).



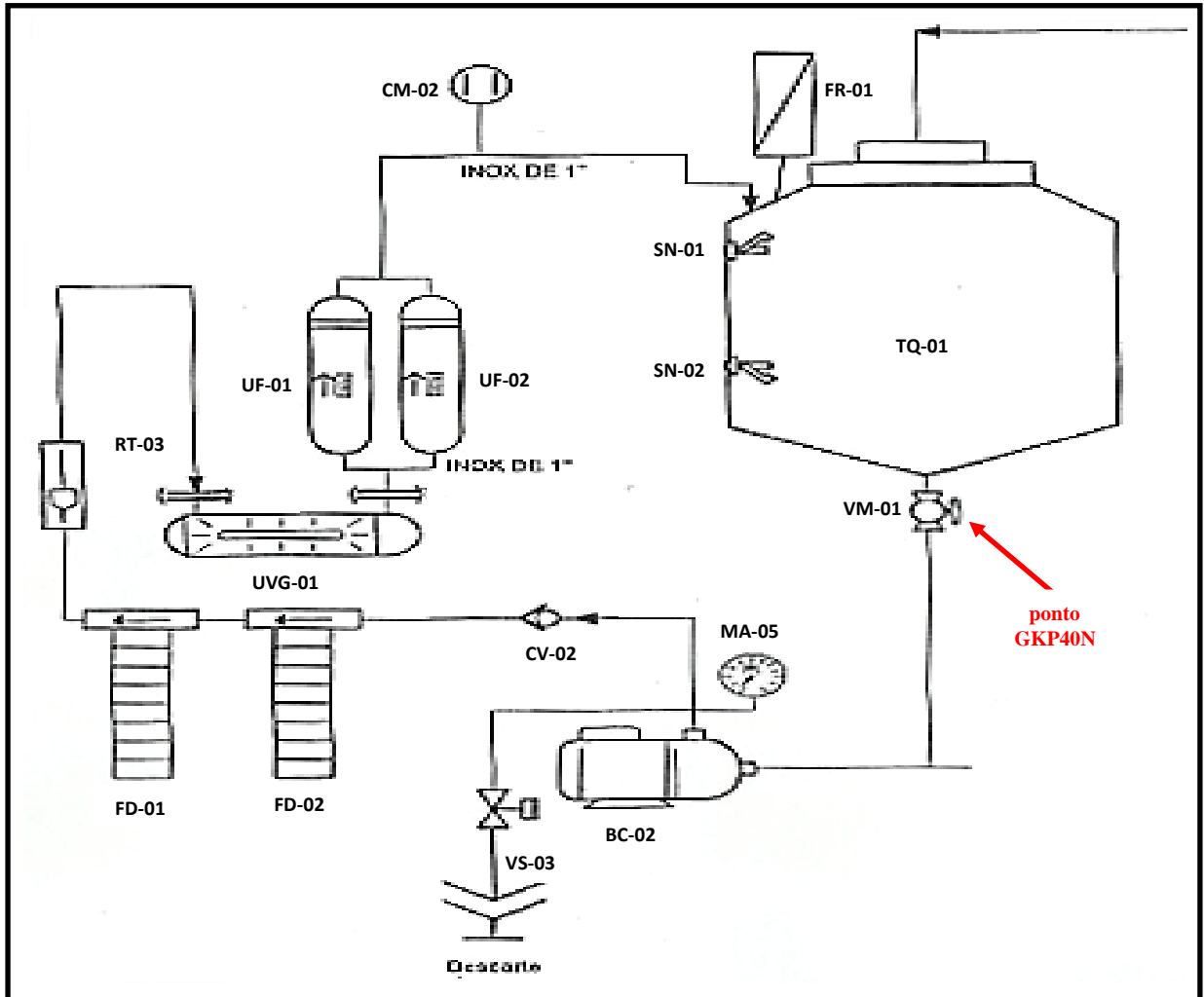
**Figura 2:** Primeira parte do sistema de geração de água purificada do prédio 40. Legenda: MA: manômetro, BC: bomba de entrada, PB: pressostato de baixa pressão, FP: filtro de partículas, FC: filtro de *carbono block*, CG: filtro de carvão ativado granulado, VS: válvula de sentido, BP: bomba procon, PA: pressostato de alta pressão, OR: osmose reversa, CM: medidor de condutividade, RT: rotâmetro, VA: válvula agulha, VS: válvula solenoide. Fonte: FARMANGUINHOS, 2012.

O ciclo de purificação tem início com o recebimento da água potável a partir do ponto de alimentação (Figura 2), pressurizada pela bomba de entrada (BC-01), no sentido do filtro de partículas (FP-01), que é o primeiro filtro da etapa de pré-tratamento e o responsável pela retenção de partículas maiores que 1  $\mu\text{m}$ . Em seguida, a água passa através dos filtros de carbono *block* (FC-01) e de carvão ativado granulado (CG-01), ambos responsáveis pela remoção do cloro. O manômetro (MA-01) presente na entrada do sistema informa a pressão de entrada da água (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).

A válvula solenoide (VS-01) é aberta assim que o sistema é ligado e permite que o fluxo de água siga na direção da bomba (BP-01), a qual pressuriza a água no sentido da membrana de osmose reversa (OR-01), após o acionamento do pressostato de baixa pressão (PB-01). Este permanece ligado sempre que a pressão verificada pelo MA-01 apresenta-se menor ou igual a 1 bar. Caso a pressão após a bomba (BP-01) seja superior ao valor ajustado (16 bar) no pressostato de alta pressão (PA-01), o mesmo desligará a bomba. Os manômetros MA-02, localizado anteriormente à BP-01 e o MA-03, situado após a bomba também são responsáveis por informar o diferencial de pressão (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).

A membrana de osmose reversa (OR-01) é a responsável pela etapa de purificação propriamente dita da água, separando o fluxo de água em permeado e concentrado. O último é direcionado para o rejeito, onde está localizado o manômetro MA-04, o qual verifica a pressão do mesmo. Em seguida, a válvula agulha (VA-01) possibilita a regulagem do descarte

do concentrado, cuja vazão é verificada por um rotâmetro (RT-01). O fluxo permeado é monitorado por um medidor de condutividade (CM-01) e por um rotâmetro (RT-02) (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).



**Figura 3:** Segunda parte do sistema de geração de água purificada do prédio 40. Legenda: FR: filtro de partícula, SN: sensor de nível, TQ: tanque de armazenamento, VM: válvula manual, BC: bomba de recirculação, MA: manômetro, VS: válvula solenoide, CV: válvula de sentido, FD: filtro deionizador, RT: rotâmetro, UVG: lâmpada de irradiação ultravioleta, UF: membrana de ultrafiltração, CM: medidor de condutividade, FR: filtro de respiro. Fonte: FARMANGUINHOS, 2012.

Após a filtração da água pela membrana de osmose reversa, o fluxo é direcionado para os filtros de resina deionizadoras (FD-01 e FD-02), responsáveis pela redução da condutividade da água (Figura 3). Em direção ao tanque de armazenamento (TQ-01), o fluxo de água tem a sua vazão medida pelo rotâmetro RT-03 e passa pela lâmpada ultravioleta germicida (UVG-01), que é responsável pela diminuição do crescimento microbiano. Em seguida, o fluxo de água passa através das membranas de ultrafiltração (UF-01 e UF-02), que

retêm mecanicamente compostos orgânicos e endotoxinas. O condutivímetro CM-02 aferirá a condutividade da água (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).

O TQ-01 tem capacidade de estocagem de 200 L, está isolado termicamente e equipado com dois sensores: um de nível alto (SN-01) e outro de nível baixo (SN-02), um filtro de respiro (FR-01), com poro de filtração de 0,22  $\mu\text{m}$  e uma válvula manual (VM-01). O SN-01, ao ser acionado, induz o desligamento do pré-tratamento, mantendo a água do TQ-01 em recirculação constante. O nível baixo de água no TQ-01 desliga o SN-02, que por sua vez desliga a bomba de recirculação (BC-02). Mesmo assim, o fluxo de água não retorna ao TQ-01, pois é impedido por uma válvula de sentido (CV-02). A pressão da BC-02 é monitorada pelo manômetro MA-05, que aumenta ou diminui a velocidade do fluxo de circulação no anel de distribuição, de acordo com a pressão aferida. A BC-02 possui ainda uma válvula solenoide (VS-03), que é utilizada em caso de sanitização ou manutenção, para drenar a água do sistema (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).

A água purificada gerada pelo sistema descrito acima atende às seguintes especificações de qualidade preconizadas pela UNITED STATES PHARMACOPEIA 32 (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2011):

- Condutividade a 25 °C: < 1,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .
- pH: entre 5 e 7.
- Carbono Orgânico Total (TOC): < 0,5 mg/L.
- Contagem do número total de micro-organismos mesófilos: < 100 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

O Sistema possui, ainda, alarme de segurança para os seguintes parâmetros (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012):

- Falta de água na alimentação do sistema gerador de água purificada.
- Queima de lâmpada ultravioleta.
- Condutividade acima de 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ , após a membrana de ultrafiltração.

O sistema gerador de água purificada de Farmanguinhos é sanitizado mensalmente, com sanitizante químico à base de glutaraldeído (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2011).

Uma vez gerada, a água purificada é mantida a uma temperatura aproximada de  $15\pm 2^\circ\text{C}$ . O TOC e a condutividade da água são verificados de forma automatizada, através de Analisador de TOC (marca: GEHAKA, modelo: TOC 2200) (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2012).

O monitoramento microbiológico da água do sistema de água do prédio 40 foi realizado através da amostragem em dois pontos de coleta: SSP40N (água potável) e GKP40N (água purificada) (Figuras 2 e 3).

## 1.2 Diversidade microbiana em sistemas de água

Embora os sistemas de água purificada, normalmente, contenham quantidades muito baixas de compostos orgânicos (TOC: <3 mg/L) e inorgânicos (condutividade <1 mS/cm), muitas bactérias são capazes de crescer nestes ambientes oligotróficos. Algumas destas cepas foram isoladas e identificadas, como *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia insidiosa*, *Afipia felis*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Staphylococcus citreus*, *Delftia acidovorans*, *Cycloclasticus oligotrophus* (BOHUS et al., 2010).

Estudos recentes demonstraram que bactérias Gram-negativas, especialmente Proteobacterias, como *Ralstonia* sp., *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bradyrhizobium* sp. predominam em sistemas de água purificada, embora bactérias Gram-positivas, leveduras e até mesmo algas também possam ser encontradas, o que demonstra a possibilidade de surgimento de comunidades microbianas complexas (BOHUS et al., 2010).

A contagem de bactérias em água é reportada em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e, geralmente, aumenta com o tempo de estocagem da água. De acordo com a FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010), os contaminantes mais frequentes são bastonetes Gram-negativos, principalmente dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e *Acinetobacter*. O padrão microbiológico de avaliação da qualidade da água consiste na ausência de indicadores de contaminação fecal.

O grupo dos coliformes é o principal indicador utilizado para avaliar a qualidade microbiológica da água e de alimentos. No entanto, este grupo é dividido em coliformes totais e termotolerantes. Os coliformes totais podem ser definidos como bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de crescer aerobicamente e anaerobicamente na presença de sais biliares e agentes tensoativos. Estas bactérias fermentam a lactose a 35 – 37°C com formação de ácido, gás e aldeído em 48 h. Além disso, os coliformes pertencem à família Enterobacteriaceae, possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase, mas não possuem a enzima oxidase.



Fazem parte deste grupo, predominantemente, bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (MOURA, 2010 e PERES, 2011).

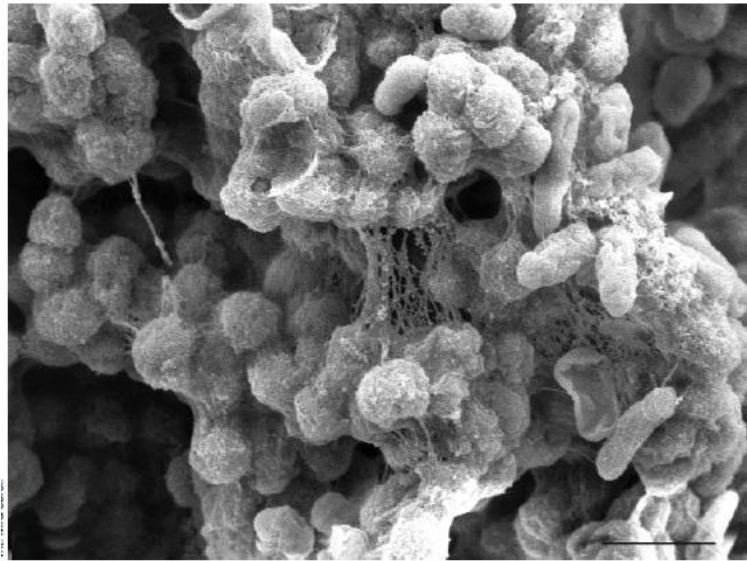
Os coliformes termotolerantes são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose, produzindo gás, quando incubadas a 44 – 45,5°C. Nestas condições, cerca de 90% das culturas de *Escherichia coli* são positivas, enquanto poucas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantêm estas características. Além disso, as cepas de *E. coli* apresentam provas bioquímicas positivas para indol e  $\beta$ -glicuronidase, porém não apresentam a enzima urease. *E. coli* é o único micro-organismo deste grupo que tem como habitat natural o trato intestinal do homem e de animais, sendo assim, a sua presença indica a contaminação fecal de produtos. Os demais micro-organismos do grupo coliformes podem habitar também outros ambientes, como vegetais e solo e sua ocorrência pode apontar a presença de outros organismos, como protozoários e vírus (MOURA, 2010 e PERES, 2011).

As bactérias proliferam em sistemas de água de alta pureza de maneira semelhante ao modo como proliferam na maior parte dos ambientes aquáticos e não aquáticos: como biofilmes. O aparecimento de biofilmes pode afetar a qualidade da água de uso farmacêutico e, conseqüentemente, a segurança do produto final (FLORJANIC & KRISTL, 2011 e PINTO et al., 2010).

### 1.3 Biofilmes

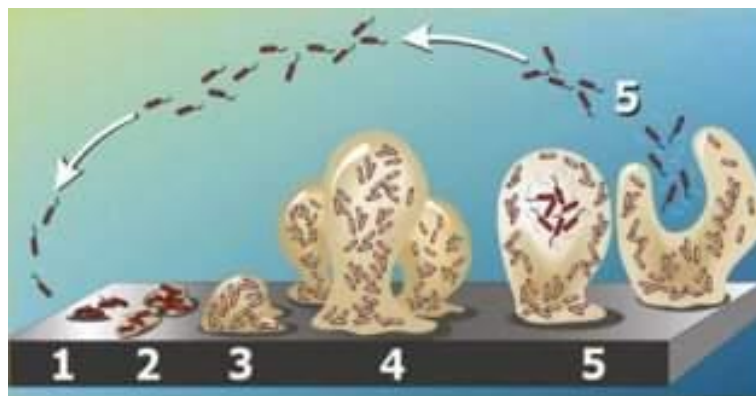
Os micro-organismos podem viver e proliferar como células individuais (forma planctônica) ou podem colonizar superfícies, onde são capazes de crescer como comunidades celulares altamente organizadas (PASTERNAK, 2009).

Biofilmes são agregados celulares aderidos uns aos outros e/ou a superfícies, através de polímeros extracelulares produzidos pelos próprios micro-organismos constituintes daquela comunidade (Figura 4) (SILVA & MARTINIS, 2013).



**Figura 4:** Micrografia eletrônica de uma película de biofilme produzida por *Salmonella enteritidis* em uma interface líquido-ar do meio Luria-Bertani, após 3 dias de incubação a temperatura ambiente. Fonte: LASA, 2006.

A formação do biofilme ocorre através de etapas sequenciais (Figura 5): logo após a deposição inicial de bactérias plânticas a uma superfície sólida, ocorre proliferação e acúmulo destes micro-organismos em agrupamentos celulares com multi-camadas e, finalmente, a formação da comunidade bacteriana inclusa em uma matriz polimérica, produzida pela própria comunidade. Uma vez que a estrutura foi desenvolvida, algumas bactérias são liberadas no meio líquido, permitindo que o biofilme se espalhe pela superfície (LASA, 2006). A principal massa do biofilme é esta matriz polimérica, denominada exopolissacarídeo, que fornece proteção adicional aos micro-organismos ali presentes, pois limita a difusão de agentes antimicrobianos e atua como fonte de nutrientes para a comunidade bacteriana (SINGH et al., 2003).



**Figura 5:** Desenvolvimento do biofilme. Este processo ocorre em 5 estágios: Estágio 1: ataque inicial das células à superfície; estágio 2: produção da matriz extracelular exopolimérica; estágio 3: desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme; estágio 4: maturação da arquitetura do biofilme; estágio 5: dispersão das células bacterianas do biofilme. Fonte: LASA, 2006 e <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010160061031>. Acesso em 06/03/2013.

O biofilme é o modo de vida microbiano mais encontrado na natureza. A transição de micro-organismos de vida livre a um estilo de vida em comunidade, aderida a uma superfície, culmina na formação de um complexo arranjo estrutural de células planctônicas, aderidas, estruturadas em microcolônias ou macrocolônias e destacadas. A sinalização célula-célula parece desempenhar um papel importante na coordenação da aderência celular ao biofilme e no descolamento celular do mesmo (FLORJANIC & KRISTL, 2011).

Em um sistema de água de alta pureza, os níveis de nutrientes são baixos, mas atingem um estado de menor energia, quando estão adsorvidos nas interfaces sólido/líquido. O biofilme se caracteriza por um crescimento microbiano exuberante na superfície de fontes de nutrientes, o que representa uma grande vantagem para esses organismos (PINTO et al., 2010).

Biofilmes constituem um modo protegido de crescimento, que permite a sobrevivência de micro-organismos, mesmo em ambientes extremamente hostis e pobres em nutrientes, como sistemas de água purificada. Somente quando os níveis de nutrientes tornam-se extremamente altos, as bactérias proliferam em estado de livre flutuação planctônica. O fenótipo, a fisiologia e o comportamento das bactérias constituintes de um biofilme diferem significativamente de bactérias da mesma espécie que, porventura, vivem na forma planctônica. Mesmo biofilmes constituídos de bactérias da mesma espécie apresentam vasta heterogeneidade em relação ao metabolismo, à expressão gênica e à fisiologia, devido a diferentes condições e diferentes microambientes (FLORJANIC & KRISTL, 2011).

Biofilmes, em sistemas de água, atuam como reservatório de micro-organismos, os quais são liberados esporadicamente na água, causando intenso aumento na densidade celular, ou seja, uma vez formado, o biofilme torna-se fonte contínua de contaminação microbiana (UNITES STATES PHARMACOPEIA, 2013). Este fato também se aplica aos patógenos, caso os mesmos estejam presentes na água. Os fatores biológicos, químicos e físicos que levam ao descolamento das bactérias do biofilme são complexos e não estão completamente elucidados. Múltiplos fatores estão associados aos processos de adesão e descolamento, como a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, estresse de cisalhamento, dentre outros. O processo de descolamento é o grande responsável pela deterioração da qualidade da água (FLORJANIC & KRISTL, 2011).

Quando as células aderem a superfícies e começam a produzir substâncias extracelulares poliméricas, a tendência é que passem da fase planctônica à fase bêntica, que requer menos energia. As substâncias poliméricas produzidas concentram traços de fatores de crescimento e protegem as células de agentes antagonistas, como biocidas e tratamento térmico (PINTO et al., 2010). Consequentemente, biofilmes presentes em sistemas para estocagem e distribuição de água purificada são difíceis de detectar, inativar e remover (FLORJANIC & KRISTL, 2010 e FLORJANIC & KRISTL, 2011).

A presença de biofilmes pode gerar outro problema grave e que demanda alto custo para as empresas farmacêuticas, que é a corrosão microbiologicamente induzida (CMI) ou a biocorrosão. Este processo ocorre em tubulações de sistemas de purificação de água, na presença ou ausência de oxigênio, causando diferentes tipos de corrosão associada a micro-organismos. A biocorrosão não difere do processo de degradação do material metálico por vias químicas e eletroquímicas, pois não é um processo isolado, mas de interação, favorecido pelas condições ambientais. Embora os micro-organismos participem do processo, não modificam a natureza eletroquímica da reação (SILVA, 2013).

A formação do biofilme pode ocorrer em minutos ou horas, conforme as condições ambientais às quais o metal está exposto. A instabilidade inicial do biofilme em formação, a sua composição não uniforme, a espessura dos depósitos de micro-organismos, o consumo de oxigênio das reações e a secreção de polissacarídeos podem limitar a difusão de oxigênio até a parte interior do biofilme, gerando pontos de aeração diferencial, que favorecem o processo corrosivo (SILVA, 2013).

A biocorrosão não está relacionada a uma única espécie de micro-organismo, mas a um consórcio de micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos (SILVA, 2013). Diante do acima

exposto, o monitoramento microbiológico frequente da água de uso farmacêutico torna-se uma prioridade (BRASÍLIA, 2013).

#### 1.4 Monitoramento microbiológico de água

Produtos farmacêuticos de uso oral e tópico (cápsulas, comprimidos, suspensões, cremes, adesivos, etc.) que não têm como requerimento serem estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana. As matérias-primas, a água e mão de obra apresentam-se como fontes importantes de contaminação microbiana e também devem ser controlados. A garantia da qualidade e o controle de fabricação previstos nas boas práticas devem garantir que os produtos e insumos cumpram as especificações determinadas, ou seja, que atendam aos limites aceitáveis para micro-organismos, os quais estão descritos em compêndios oficiais e normas regulamentadoras. Os mesmos estipulam limites máximos de presença de micro-organismos em produtos ou insumos e a ausência de alguns patógenos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010),

Durante a década de 1960, em decorrência do crescente número de relatos de infecções atribuídas a produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos contaminados, estudos foram iniciados, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, para avaliar a dimensão do problema, elaborar recomendações e identificar as fontes dos contaminantes (PINTO et al., 2010).

A microbiologia exerce, portanto, um papel fundamental na indústria farmacêutica e as agências regulatórias exigem que produtos e insumos farmacêuticos de todos os tipos sejam adequadamente controlados em relação ao potencial de contaminação microbiana, principalmente, no que se refere ao impacto na qualidade do produto e na segurança do paciente. Este conceito foi reconhecido nos anos 1970, quando a Federação Internacional Farmacêutica propôs critérios microbiológicos para preparações e insumos farmacêuticos não estéreis. Dependendo do uso do produto, diferentes limites com relação à contagem de micro-organismos viáveis e à ausência, ou presença limitada, de determinadas bactérias foi sugerida. Os micro-organismos especificados foram escolhidos por serem patógenos conhecidos (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), indicadores de contaminação fecal (*Escherichia coli*), ou indicadores de baixos níveis de higiene (Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*). Testes de ausência para organismos indicadores foram inicialmente usados na Indústria

Alimentícia e depois adotados pela Indústria Farmacêutica. Para se considerar, com segurança, um organismo como indesejável, deve-se avaliar a sua patogenicidade, a sua provável origem e o seu potencial de deterioração do produto ou insumo (PINTO et al., 2010).

Para a realização dos testes microbiológicos, devem ser considerados os limites microbianos, o tipo de contaminação mais provável nas diferentes categorias de produtos e insumos e a via de administração dos mesmos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Em geral, o monitoramento da água de uso farmacêutico se baseia no controle microbiológico e nos parâmetros que assegurem a manutenção da qualidade da água desejada. Amostras contendo agentes sanitizantes devem ser neutralizadas antes de proceder à análise. Os ensaios microbiológicos devem ser realizados após curto intervalo de tempo da coleta da amostra, ou esta deverá ser refrigerada adequadamente e por tempo determinado, para preservar as características originais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O controle microbiológico da qualidade da água utilizada em processos farmacêuticos é importante, pois micro-organismos podem sobreviver e proliferar em sistemas de água e se tornarem fontes de contaminação microbiana e pirogênica. Se a água contaminada é utilizada no produto farmacêutico final, os micro-organismos contaminantes, assim como seus metabólitos, podem gerar consequências adversas (KAWAI et al., 2002).

O controle de qualidade químico e microbiológico da água durante os processos de produção, armazenamento e distribuição é uma grande preocupação. Ao contrário de outros produtos e ingredientes do processo, a água é normalmente retirada de um sistema sob demanda e não está sujeita a testes de liberação de lote antes do uso. Garantir a qualidade deste insumo torna-se, portanto, essencial. Além disso, certos testes microbiológicos podem exigir períodos de incubação e, portanto, os resultados tendem a ser liberados posteriormente à utilização da água (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

É necessário fornecer informações suficientes para controlar a qualidade microbiológica da água produzida, rapidamente e com precisão. Os métodos de monitoramento devem ser capazes de elucidar o número e os tipos de micro-organismos considerados significativos em relação a cada sistema de água individualmente e de impacto aos produtos finais (KAWAI et al., 2002). Na maioria das aplicações, o monitoramento da água de uso farmacêutico se baseia no controle microbiológico e nos parâmetros que assegurem a manutenção da qualidade da água desejada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No monitoramento microbiológico da água, os limites de alerta e de ação deverão ser contemplados (PINTO et al., 2010):

- Limites de alerta são níveis ou faixas que, quando excedidos, demonstram que um processo pode ter sofrido alterações em relação a sua condição normal. Portanto, este tipo de limite representa advertência, logo, não necessariamente exige ação corretiva.
- Limites de ação são níveis ou faixas que, quando excedidos, indicam um desvio de processo de sua faixa de operação normal. Neste caso, há a necessidade de ação corretiva.

Os limites de alerta devem estar abaixo dos limites de ação. Normalmente, os mesmos são estabelecidos com base na revisão histórica dos dados de monitoramento de água. Considera-se prudente que o limite de alerta seja 50%, ou menos, do limite de ação (PINTO et al., 2010).

### 1.5 A água na Indústria Farmacêutica

A água é um insumo essencial para a indústria farmacêutica, por apresentar-se como um dos principais componentes de um medicamento. Devido a isso, a água deve ser criteriosamente analisada com relação aos seus contaminantes, já que pode conter substâncias que prejudicam tanto a qualidade dos medicamentos, como a durabilidade dos sistemas de purificação de água (OLIVEIRA & PELEGRINI, 2011).

A água possui estrutura química peculiar, com um momento dipolo e grande facilidade em formar ligações de hidrogênio. Estas características tornam a água um excelente meio para solubilizar, absorver, adsorver ou suspender diversos compostos, assim como, para carrear contaminantes e substâncias indesejáveis, que poderão alterar a pureza e a eficácia de um produto farmacêutico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O processo de purificação da água para uso farmacêutico baseia-se na exclusão de impurezas físico-químicas, biológicas e microbiológicas, de modo que os níveis de qualidade prescritos pelas autoridades sanitárias nos compêndios oficiais sejam cumpridos (BRASÍLIA, 2013).

O controle de qualidade microbiológico deve ser prioridade nas companhias farmacêuticas, já que alguns tipos de micro-organismos são capazes de proliferar nos diversos componentes dos sistemas de tratamento e de distribuição da água para uso farmacêutico. Diante disso, torna-se fundamental a busca de tecnologias e ações capazes de minimizar a contaminação microbiológica deste insumo (BRASÍLIA, 2013).

Os contaminantes microbianos são representados, principalmente, por bactérias originárias da própria microbiota da fonte de água e, também, de alguns equipamentos de purificação. Podem surgir, também, devido a procedimentos de limpeza e sanitização inadequados, os quais levam à formação de biofilmes e, conseqüentemente, instalam um ciclo contínuo de crescimento a partir de compostos orgânicos, que se tornam nutrientes para os micro-organismos. As bactérias podem afetar a qualidade da água, através da inativação de reagentes ou alteração de substratos por ação enzimática, aumentando, assim, o conteúdo em carbono orgânico total e produzindo pirogênios (qualquer substância capaz de induzir elevações térmicas) e endotoxinas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os processos de geração, armazenamento e distribuição de água para uso farmacêutico devem ser projetados, instalados, qualificados e mantidos, de modo a garantir a confiabilidade da água produzida. É necessário validar o processo de geração da água, para garantir que a mesma seja produzida conforme as especificações estabelecidas e dentro da capacidade projetada. A capacidade do sistema deve ser desenhada para atender à demanda média e à demanda de pico do fluxo de operação vigente. Se necessário, o sistema deve ser concebido para permitir o aumento de sua capacidade ou para permitir modificações. Todos os sistemas, independentemente de sua dimensão e capacidade, devem ter recirculação e rotação adequados, para assegurar os controles químicos e microbiológicos apropriados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Ainda de acordo com a OMS, as fontes de água e a água tratada devem ser monitoradas química e microbiologicamente com regularidade. Quando aplicável, o monitoramento dos níveis de endotoxinas também deve ser realizado. Os registros obtidos a partir dos resultados de monitoramento, análise de tendências e de quaisquer ações tomadas devem ser mantidos. Nas companhias em que a sanitização química dos sistemas de água faz parte do programa de controle de biocontaminação, um procedimento validado deve ser seguido para garantir que o processo de desinfecção seja efetivo e que o agente sanitizante seja removido de forma eficaz (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Os diferentes tipos de pureza da água apresentam suas próprias características microbiológicas, que são relacionadas ao método e ao grau de purificação, assim como a sua estocagem e distribuição (PINTO et al., 2010).

Os requisitos de qualidade da água dependerão de sua finalidade e utilização, e a escolha do sistema de purificação adequado deve atender ao grau de pureza estabelecido. O usuário é responsável pela escolha do tipo de água apropriado aos seus objetivos e pelos



controles necessários, com uma frequência que permita garantir a manutenção da qualidade desejada. O usuário deve assegurar, ainda, que o sistema de água selecionado apresente desempenho adequado e capacidade para fornecer água com o nível de qualidade estabelecido, de forma a atender aos parâmetros especificados nas monografias correspondentes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No Brasil, os requisitos de água para uso farmacêutico são definidos em normas técnicas de Boas Práticas de Fabricação (BPF), cujo documento vigente é a RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, e na Farmacopeia Brasileira, que se encontra na 5ª edição. Esses documentos são publicados pela ANVISA, mas têm como base recomendações internacionais (BRASÍLIA, 2013).

Os requisitos de BPF aplicados aos diversos tipos de água para uso farmacêutico sofrem atualização constante, com o objetivo de redução dos riscos de contaminação química, biológica ou microbiológica (BRASÍLIA, 2013).

Basicamente, há três tipos de água para uso farmacêutico: a água purificada (AP); a água para injetáveis (API) e a água ultrapurificada (AUP). Além destas, é importante comentar acerca da água potável, que é amplamente utilizada e tem aplicação direta em instalações farmacêuticas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 1.5.1 Água potável

A água potável é um tipo de água comumente usado pela indústria farmacêutica (PINTO et al., 2010). Este tipo de água é o ponto de partida para qualquer processo de purificação de água para fins farmacêuticos, sendo obtida por tratamento da água retirada de mananciais, através de processos apropriados, a fim de atender às especificações da legislação brasileira referentes aos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e radioativos, conforme um determinado padrão de potabilidade. A água potável é empregada, normalmente, nas etapas iniciais de procedimentos de limpeza, como fonte de obtenção de água de mais alto grau de pureza, na climatização térmica de alguns aparatos e na síntese de ingredientes intermediários (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A composição microbiana da água potável varia de acordo com a sua origem e conforme a época do ano, pois sofre influência da disponibilidade de nutrientes e temperatura.

No caso do abastecimento urbano de água no Brasil, o cloro é o agente responsável pela baixa carga microbiana (PINTO et al., 2010).

A Portaria nº 2.914 de 2011 do Ministério da Saúde recomenda, como teste microbiano para água potável, a pesquisa de *Escherichia coli*, que deve estar ausente em 100 mL de amostra testada (BRASIL, 2011). A presença de *E. coli* pode indicar a existência de outros micro-organismos potencialmente patogênicos e vírus de origem fecal. No entanto, a ausência de *E. coli* não exclui a possível presença de outros micro-organismos, que poderiam ser considerados deteriorantes, se encontrados em um insumo farmacêutico ou no produto acabado (UNITES STATES PHARMACOPEIA, 2013). Portanto, a água potável deve atender aos limites especificados, pois os mesmos garantem o mínimo de segurança na ingestão da mesma e minimizam as chances de traços dos contaminantes permitidos estarem presentes nos equipamentos lavados, no vapor e até mesmo nas águas purificadas empregadas na fabricação e na formulação de formas de dosagem (PINTO et al., 2010).

### 1.5.2 Água purificada

Água purificada é a água potável que passou por algum tipo de tratamento para a eliminação dos possíveis contaminantes, de forma a atender aos requisitos de pureza estabelecidos nos compêndios oficiais. Este tipo de água é um dos insumos mais utilizados em áreas farmacêuticas. Em geral, os métodos mais comuns e confiáveis para obtenção de água purificada são a troca iônica, a osmose reversa e a ultrafiltração e a mesma deve estar livre da adição de quaisquer substâncias dissolvidas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 e BRASÍLIA, 2013). Geralmente, a água purificada é utilizada na preparação de medicamentos não-estéreis tópicos e orais, assim como nos processos de granulação de comprimidos e cápsulas. Pode, também, ser utilizada na obtenção de água para injeção e vapor limpo de grau farmacêutico (PINTO et al., 2010).

A FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010) recomenda, como testes microbianos para água purificada, a contagem do número total de micro-organismos mesófilos (ou a contagem de bactérias heterotróficas), que não deve ultrapassar 100 UFC/mL. Micro-organismos mesófilos são aqueles cuja temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 37°C (BROOKS et al., 2010). O teste inclui a detecção inespecífica de bactérias, componentes da microbiota natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de

distribuição, fornecendo, portanto, informações adicionais sobre eventuais falhas na desinfecção, colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição. Quando a água purificada for coletada de reservatório de acondicionamento, além da contagem do número total de micro-organismos mesófilos ou de bactérias heterotróficas (micro-organismos que necessitam de carbono orgânico como fonte de nutrientes), deve ser realizada a pesquisa de micro-organismos patogênicos. A água testada deve estar ausente de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em 100 mL, principalmente se a água for utilizada em produtos de uso tópico (DOMINGUES et al., 2007 e FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 1.5.3 Água ultrapurificada

Água ultrapurificada é a água purificada que passou por tratamento adicional para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos nos compêndios oficiais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). É utilizada na preparação de medicamentos que necessitem de água de alta qualidade biológica, como medicamentos estéreis que não tenham por exigência a apirogenicidade. Dentre eles, podemos citar as preparações oftálmicas, otológicas, nasais e cutâneas. (PINTO et al., 2010). Este tipo de água pode ser obtido através de uma combinação de métodos, como osmose reversa, ultrafiltração e deionização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010) prescreve, como teste microbiano para água ultrapurificada, somente, a contagem do número total de micro-organismos mesófilos. Já a OMS define que a água ultrapurificada deve atender aos mesmos padrões de qualidade da API, incluindo os limites microbianos e de endotoxinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

### 1.5.4 Água para injetáveis

Água para injetáveis é a água de mais alta qualidade usada pela indústria farmacêutica, sendo empregada como veículo na preparação de medicamentos de administração parenteral.

Para esta água ser utilizada com segurança, deve ser estéril no momento da reconstituição do produto estéril e ser isenta, ou conter baixa concentração de endotoxina bacteriana, evitando assim, a ocorrência de efeitos farmacológicos adversos. As endotoxinas são complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas e constituem-se na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica (PINTO et al., 2010).

Para a obtenção de API, normalmente, utiliza-se o processo de destilação, por ser a técnica mais robusta, devido à mudança de fase da água e ao equipamento, que é operado a temperaturas muito elevadas. O uso da tecnologia de osmose reversa para a produção de API aumenta o risco de contaminação microbiológica, devido a uma série de fatores, como: a formação de biofilme, que se inicia em minutos, em ambos os lados da membrana de osmose reversa; a alta concentração de subprodutos metabólicos, que acabam por atravessar a membrana; muitos tipos de membrana de osmose reversa não suportam a sanitização em altas temperaturas (BRASÍLIA, 2013).

A FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010) prescreve, como testes microbianos para água para injetáveis: a contagem do número total de micro-organismos mesófilos, que não deve ultrapassar 10 UFC/100 mL e o teste de endotoxinas bacterianas, cujo resultado obtido deve ser, no máximo 0,25 UE (unidades de endotoxinas) por mL.

A Tabela 1 abaixo contém um resumo dos testes microbiológicos exigidos para os tipos de água mais utilizados para uso farmacêutico e os limites exigidos para cada um deles.

**Tabela 1:** Testes microbiológicos exigidos para os tipos de água mais utilizados na Indústria Farmacêutica e limites.

<b>Tipo de Água</b>	<b>Testes Microbiológicos Exigidos</b>	<b>Limites</b>
Água Potável	Contagem Total de Micro-organismos Mesófilos	500 UFC/mL
	<i>Escherichia coli</i>	ausência/100 mL
Água Purificada	Contagem Total de Micro-organismos Mesófilos	100 UFC/mL
	Coliformes Totais	ausência/100 mL
	<i>Escherichia coli</i>	ausência/100 mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ausência/100 mL
Água para Injetáveis	Contagem Total de Micro-organismos Mesófilos	10 UFC/100 mL
	Endotoxinas Bacterianas	0,25 UE/mL
Água Ultrapurificada	Contagem Total de Micro-organismos Mesófilos	1 UFC/100 mL

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010 e BRASIL, 2011.

No presente trabalho, será dado um enfoque maior à água do tipo purificada, por ser o tipo de água gerada pelo sistema GEHAKA, presente na planta de produção de medicamentos à base de penicilina, em Farmanguinhos (item 1.1.1).

## 1.6 Métodos de análise microbiológica

As análises microbiológicas tradicionais utilizadas em controle de qualidade de produtos industrializados foram desenvolvidas a partir do final do século XIX e têm sido utilizadas pelos microbiologistas desde então (VASAVADA et al., 1993), representando grande valor no controle e na segurança da produção de medicamentos. A forma de execução dos métodos microbiológicos convencionais está disponível detalhadamente e de forma gratuita, assim como a composição dos meios de cultura nele utilizados, os quais podem ser obtidos a partir de diferentes fornecedores. Estes métodos ainda são utilizados por muitos laboratórios e agências regulatórias, por serem métodos harmonizados, validáveis e por não exigirem infraestrutura muito onerosa (JASSON e cols, 2010). No entanto, os resultados fornecidos por eles são obtidos somente após longo período de incubação. Os métodos convencionais raramente permitem a execução de ações pró-ativas e corretivas, em tempo hábil. Além disso, a execução dos mesmos é laboriosa e requer grandes volumes de reagentes e meios de cultura (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013).

Há três tipos principais de determinações específicas para testes microbiológicos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013):

- Testes qualitativos, para a determinação de presença ou ausência de micro-organismos. Nas análises microbiológicas convencionais, este tipo de teste é caracterizado pela observação de turbidez, ou outra alteração relacionada ao crescimento microbiano, em um meio de cultura, como evidência da presença de micro-organismos viáveis na amostra testada.
- Testes quantitativos, para a enumeração de micro-organismos. Contagem em Placa, Filtração por Membrana e Número mais Provável (NMP) (semi-quantitativo) são métodos convencionais utilizados para estimar o número de micro-organismos viáveis em uma amostra.
- Testes de identificação. A caracterização morfológica e bioquímica são os métodos clássicos de identificação microbiana. Alguns métodos desenvolvidos recentemente têm simplificado e automatizado aspectos desta identificação. Várias novas abordagens têm sido integradas a estes métodos, como: reações bioquímicas, utilização de fonte de carbono, caracterização da composição de ácidos graxos, padrões de bandas de endonucleases de restrição e análise da sequência de rRNA (ácido ribonucleico ribossômico) 16S. O ribossomo de

procariotos é constituído pelas subunidades 30S e 50S (os números 30S e 50S significam unidades de coeficientes de sedimentação). A subunidade 30S é composta por rRNA 16S e proteínas, enquanto a subunidade 50S é composta por rRNA 5S e 23S e proteínas. O gene rRNA 16S é utilizado para estudos filogenéticos, uma vez que é altamente conservado entre diferentes espécies de procariotos (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2000).

A escolha do método a ser utilizado deve ser baseada na natureza da água e no número esperado de micro-organismos contaminantes. Os compêndios oficiais já permitem, também, a utilização de métodos alternativos automatizados, desde que os mesmos sejam equivalentes ou melhores que os métodos compendiais e que estejam devidamente validados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013 e EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2013).

Dentre os métodos alternativos utilizados para a enumeração microbiana, sistemas modernos, como o *AutoPlate 4000* (*SpiralBiotech, Norwod, Estados Unidos*) e o *protoCOL* (*Symbiosis, Cambridge, Reino Unido*) são completamente automatizados, sendo assim, capazes de processar as amostras, o que inclui plaqueamento, contagem, cálculo e transferência dos dados diretamente ao *software*. Ambos são bastante usados nas indústrias de alimentos e água. Sistemas de cultura, como *Petrifilm* (*3M Worldwide, França*) e *SimPlate* (*Biocontrol Systems LTD, Londres, Reino Unido*) foram desenvolvidos para substituir a tradicional placa de ágar sólido e também são mais utilizados na indústria de alimentos, embora algumas empresas farmacêuticas já os tenham adotado (JASSON et al., 2010 e PINTO et al., 2010).

Um ensaio quantitativo de bioluminescência do ATP (adenosina trifosfato) tem sido utilizado para análises microbiológicas de água em ambientes farmacêuticos e tem demonstrado mais rapidez e eficiência que os métodos convencionais (JIMENEZ et al., 2000). Esta técnica mede a emissão de luz produzida, em decorrência da presença de ATP, que está envolvido em uma reação enzima-substrato entre a luciferina e a luciferase. A quantidade de luz produzida é proporcional à quantidade de ATP e, conseqüentemente, ao número de micro-organismos da amostra original. Para garantir que uma quantidade suficiente de ATP seja gerada e detectada, realiza-se uma etapa preliminar de incubação. Esta técnica é geralmente utilizada como um rápido indicador da carga microbiana total, já que a presença de ATP não está restrita somente às células bacterianas (JASSON et al., 2010).

Outra técnica que tem sido bastante utilizada para a análise microbiológica de água é a contagem direta de células microbianas marcadas com um corante fluorescente, específico para DNA (ácido desoxirribonucleico). Esta técnica utiliza algumas etapas para impedir que os micro-organismos mortos também sejam contados e possibilita uma análise microbiológica de água em tempo curto o suficiente para a resolução de problemas decorrentes de resultados fora de especificação. Entretanto, não se sabe ainda o impacto regulatório desta técnica, já que fornece resultados superiores aos das contagens em placas. Mesmo assim, a tecnologia já foi aceita pelo FDA (PINTO et al., 2010).

Os métodos moleculares baseados na identificação e amplificação de ácidos nucleicos demonstram um enorme potencial para a detecção de micro-organismos isolados a partir de métodos de cultura convencionais. Estes métodos são capazes de detectar micro-organismos cultiváveis e não cultiváveis em água, além de detectarem a presença de patógenos. Algumas características da microbiologia da água afetam a performance de técnicas moleculares, como a composição variada das amostras de água, a contagem, em geral, baixa dos micro-organismos pesquisados e o estado fisiológico dos mesmos. A padronização destas técnicas, considerando parâmetros como acurácia e robustez, é um importante desafio para a implantação das mesmas em rotinas laboratoriais (JOFRE & BLANCH, 2010).

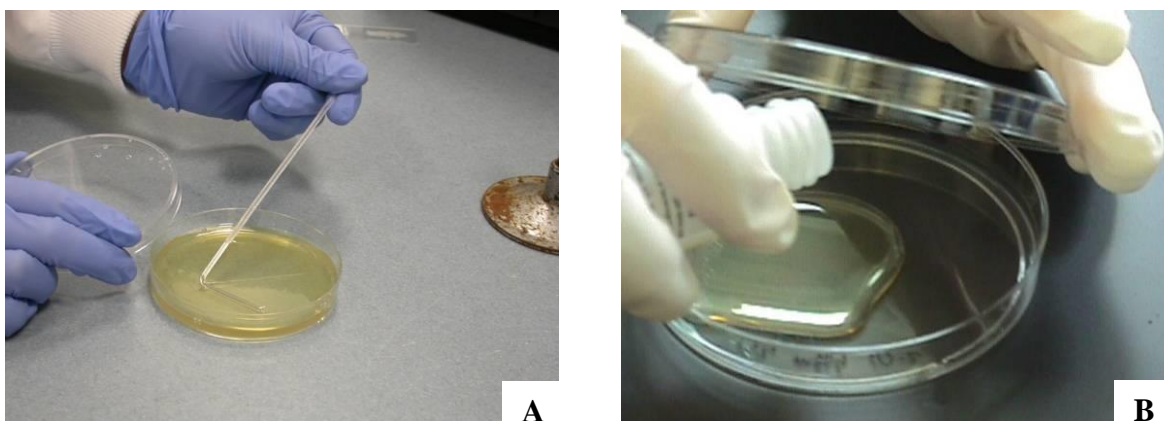
No próximo item deste trabalho, os métodos convencionais serão abordados mais detalhadamente, por serem estes os métodos ainda utilizados pelo Laboratório de Controle Microbiológico de Farmanguinhos.

#### 1.6.1 Contagem do número total de micro-organismos mesófilos

A FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010) recomenda a utilização do método de filtração por membrana ou outra metodologia que se revele igual ou superior a método farmacopeico validado, para a contagem total de micro-organismos mesófilos. Em geral, os laboratórios utilizam o método de filtração por membrana ou de contagem em placa.

### 1.6.1.1 Contagem em placa

O método de contagem em placa visa a estimar o número de células viáveis, ou seja, capazes de se reproduzir, em uma amostra. Esta metodologia envolve a transferência de alíquotas da amostra, dependendo da técnica utilizada, para réplicas de placas de Petri estéreis, já contendo meio de cultura sólido (método de superfície - Figura 6A) ou a serem preenchidas por meio liquefeito (método de profundidade - Figura 6B). Como uma colônia normalmente é originada a partir de uma única célula, o total de colônias que se desenvolve no meio, em geral, corresponde ao número de células viáveis presentes na alíquota analisada (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013 e MOURA, 2010).



**Figura 6:** Imagens demonstrativas do método de Contagem em placa. **A:** Método de superfície. **B:** Método de profundidade. Fonte: <http://www.hsri.mmu.ac.uk/microbiology/images//free/rev/spread.jpg>. Acesso em 07/03/2013.

Dentre as desvantagens da metodologia de contagem em placa, destacam-se: as características do produto analisado podem conferir opacidade ao meio, dificultando a contagem das colônias; as condições de incubação podem interferir no crescimento bacteriano; o crescimento de duas colônias muito próximas pode levar à formação de apenas uma colônia, gerando erro na contagem obtida; longo período para a liberação do produto; variações de resultados entre os analistas. Além disto, essa metodologia não se aplica a amostras com carga microbiana inferior a 1 UFC/mL, admitindo-se a sementeira de 1 mL do produto, sem diluição (MOURA, 2010 e PINTO et al., 2010).

Em julho de 2002, as monografias de água da Farmacopeia Europeia foram revisadas e o tipo de meio de cultura usado para determinar a contagem total de aeróbios foi alterado. O meio rico em nutrientes ágar caseína-soja (TSA), anteriormente utilizado, foi substituído pelo

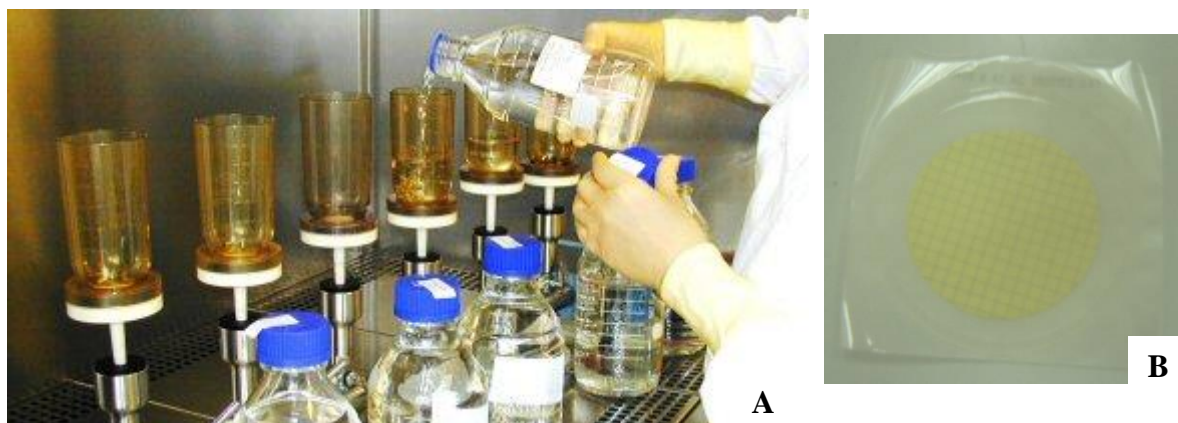


meio pobre em nutrientes, R2A. Esta alteração foi consequência do reconhecimento de que contagens de aeróbios feitas com meios pobres em nutrientes e a temperaturas baixas de incubação são de 5 a 10 vezes maiores do que aquelas obtidas em meios ricos em nutrientes. Isto se deve ao fato de que bactérias sob alterações físicas e queda metabólica sobrevivem em ambientes oligotróficos. Bactérias na fase planctônica, que requer muita energia, são coletadas e contadas. Quando aderem a superfícies, passam à forma bêntica, tornando-se muito difíceis de cultivar em meios ricos e complexos e, por isso, têm sido descritas como viáveis, mas não cultiváveis (VNC). Torna-se, portanto, essencial o conhecimento de que na dependência da técnica de cultivo, somente uma fração da população microbiana será detectada. Devido a isso, geralmente, as especificações para água são descritas como limites de ação, e não limites passa/falha (PINTO et al., 2010).

#### 1.6.1.2 Filtração por membrana

No método de filtração por membrana (Figura 7), alíquotas do produto, sob a forma líquida, ou suas diluições, são filtradas através de membranas apropriadas. Em geral, os compêndios oficiais indicam o uso de membranas de, no máximo, 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, para a análise de água por filtração por membrana. No entanto, já se discute a possibilidade de utilização de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, já que há dados na literatura que demonstram a capacidade de alguns micro-organismos penetrarem através de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Há trabalhos, inclusive, que descrevem a habilidade de bactérias, como *Ralstonia pickettii* e *Hydrogenofaga psedudoflora*, de penetrar através de membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Esta metodologia é vantajosa por permitir volumes elevados na amostragem e pela acuidade. No entanto, o número de colônias por membrana não deve ultrapassar 100, para que seja possível a contagem das mesmas, sem que haja confluência (PINTO et al., 2010).



**Figura 7:** Imagens demonstrativas do aparato utilizado no método de Filtração por membrana. **A:** Equipamento de *Manifold* adaptado para a filtração de seis amostras. **B:** Membrana de nitrocelulose. Fonte: <http://www.pharmacontrol.se/us/service2.aspx#thumb> arquivo pessoal. Acesso em 07/03/2013.

#### 1.6.1.3 Número mais provável

A precisão e a acurácia do método do NMP é menor em relação à contagem em placa e à filtração em membrana, especialmente, para a contagem de fungos e leveduras, onde os resultados obtidos não são confiáveis. Diante disso, o NMP é utilizado na contagem total de micro-organismos aeróbios, somente, em situações onde não há outro método disponível (UNITES STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Uma vantagem do emprego do NMP consiste em permitir melhor revitalização de micro-organismos debilitados, em função do perfeito contato da amostra com o meio de cultura, pois, nestes casos, o uso de meio sólido fundido não lhes seria favorável, devido a sua temperatura no momento da homogeneização (PINTO et al., 2010).

O NMP é amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia de alimentos ou ambiental, na quantificação de micro-organismos em água, leite e outros produtos. Esta metodologia é basicamente utilizada para a pesquisa de coliformes totais e coliformes termotolerantes.

A determinação do NMP de micro-organismos baseia-se em estimativa fundamentada em probabilidade. Assim, indica um valor dentro de uma faixa, que reflete o número de micro-organismos presente. A metodologia emprega meios líquidos, usando-se diluições seriadas das amostras inoculadas dos mesmos e exige a disponibilidade de tabelas estatísticas

específicas, para a obtenção dos resultados a partir da leitura das mesmas (PINTO et al., 2010).

### 1.6.2 Pesquisa de patógenos

Micro-organismos indesejáveis são definidos como quaisquer organismos capazes de causar infecções, quando o produto é utilizado conforme as orientações, ou quaisquer organismos capazes de se desenvolver no produto. Embora as especificações estabeleçam a ausência de microorganismos indesejáveis, ainda existem dúvidas, devido à escassez de métodos oficialmente propostos. A recuperação de micro-organismos suspeitos do meio sólido, para posterior identificação, apresenta limitações, devido à baixa sensibilidade de detecção. Diante disso, já foram feitas sugestões de testes que empregam cultivo de enriquecimento, utilizando 100 mL de amostra. Nestes casos, a amostra é filtrada e o filtro é transferido a 100 mL de caldo caseína soja, ou então, 100 mL da amostra são adicionados diretamente a 100 mL do caldo duplamente concentrado. A incubação deve ocorrer por 48 a 72 h. Em seguida, ocorre o plaqueamento em ágar seletivo e posterior identificação do micro-organismo. A grande vantagem deste método é a utilização do meio líquido, que é fundamental para a recuperação dos micro-organismos estressados (PINTO et al., 2010).

No entanto, a pesquisa de patógenos em água é realizada, geralmente, através da filtração de 100 mL de amostra, subsequente transferência da membrana para ágar seletivo e incubação do mesmo por 48 a 72 h, a 30 – 35°C. Para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, o meio de cultura mais indicado é o ágar Cetrimide. Para a pesquisa de coliformes totais, utiliza-se com frequência o ágar Violeta Vermelho Neutro Bile (VRB) e para a pesquisa de *Escherichia coli*, o ágar MacConkey. No entanto, podem ser utilizados outros meios que possuam propriedades nutritivas e seletivas similares para as espécies microbianas pesquisadas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 1.6.3 Identificação microbiana

Geralmente, não é necessário identificar os micro-organismos presentes na água, mas sim, proceder à contagem total dos mesmos, por meio de método adequado para abranger uma ampla gama de organismos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), como já foi descrito anteriormente. No entanto, a identificação das bactérias em água é importante nos casos em que micro-organismos específicos aquáticos possam ser potencialmente prejudiciais para os produtos ou processos nos quais a água é utilizada. As informações obtidas sobre estes micro-organismos podem também ser úteis na identificação da fonte de contaminação microbiana de um produto ou processo (UNITES STATES PHARMACOPEIA, 2013).

De forma geral, algum tipo de caracterização dos micro-organismos isolados deve ser um elemento necessário ao monitoramento do sistema de água. Identificação baseada unicamente na cultura pode render informações valiosas. Porém, a formação de colônias por micro-organismos é dependente das condições de crescimento, tais como os meios nutrientes e a temperatura de incubação. Além disso, é bem reconhecido que micro-organismos aquáticos não podem ser cultivados sob condições convencionais. Estes organismos sofrem alterações de seu estado fisiológico, passando ao estado VNC, como já foi relatado anteriormente. Isto é particularmente importante ao se avaliar as bactérias patogênicas, uma vez que podem ser indetectáveis por métodos de cultivo padrão, mas podem permanecer viáveis (KAWAI et al., 2002).

A caracterização microbiana pode incluir a identificação e a tipagem da cepa, se necessário. A caracterização microbiana de rotina pode incluir a determinação da morfologia da colônia, da morfologia celular, a coloração de Gram ou outra técnica de coloração diferencial e certas reações bioquímicas, que podem ser diferenciais, como as provas de oxidase, catalase e coagulase. A caracterização microbiana a este nível é suficiente para algumas análises de risco, em áreas de fabricação de produtos não-estéreis. No entanto, em alguns casos, a identificação em nível de gênero e espécie torna-se necessária. Além disso, já há metodologias disponíveis, as quais fornecem resultados de tipagem da cepa em questão, o que pode ser útil para se determinar a fonte do micro-organismo contaminante. Isto é comum em casos em que haja a recuperação de um micro-organismo em taxas anormalmente elevadas ou em números que excedam os níveis recomendados para categorias específicas de produtos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

A identificação da colônia de interesse pode ser realizada através de métodos fenotípicos ou genotípicos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

#### 1.6.3.1 Métodos fenotípicos

Os métodos fenotípicos utilizam os produtos da expressão gênica para distinguir entre diferentes micro-organismos e requerem um grande número de células em culturas puras. No entanto, micro-organismos estressados e recentemente isolados podem não expressar plenamente suas propriedades fenotípicas, o que poderá comprometer a identificação dos mesmos por métodos fenotípicos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

A maior parte dos sistemas de identificação que têm como base a utilização de substratos foi desenvolvida, inicialmente, para a identificação de enterobactérias e a seguir foram expandidos para Gram-positivos, não fermentadores, anaeróbicos e fungos. As bases de dados eram direcionadas para os isolados clínicos, que foram os estimuladores para o desenvolvimento desses sistemas. Posteriormente, a indústria alimentícia e mais recentemente a de cosméticos, a farmacêutica e a de correlatos também passaram a utilizá-los. No entanto, ainda há bastante fragilidade nas bases de dados para micro-organismos específicos importantes (PINTO et al., 2010).

Dentre os métodos fenotípicos, os ensaios bioquímicos são bastante comuns. Estes ensaios são, geralmente, precedidos pela coloração de Gram, ou outra forma de diferenciação, para que se decida sobre o protocolo mais adequado a seguir. Suspensões de células microbianas são submetidas a reações bioquímicas, a partir de substratos fornecidos e reagentes utilizados. Os micro-organismos apresentam reações específicas, quando utilizam determinadas fontes de nutrientes. A identificação da colônia de interesse é obtida após a comparação do perfil de reação bioquímica da mesma com uma base de dados. Estes métodos podem ser aplicados manualmente ou através de instrumentos automatizados. Como exemplo destes ensaios bioquímicos, pode-se citar as galerias API® (*BioMerieux*), que são pequenos microtubos contendo substratos desidratados, os quais são reconstituídos quando um pequeno volume de suspensão é adicionado aos tubos. A galeria é incubada sob condições apropriadas de tempo e temperatura e a identificação é obtida através da comparação do perfil de reações obtido com uma lista de referência, fornecida pelo fabricante, que relaciona espécies isoladas. Os resultados também podem ser lidos por um *software*, fornecido pelo fabricante. Já o

Vitek<sup>®</sup> (*BioMerieux*) é um sistema de identificação mais sofisticado e automatizado que o API. Diferentes cartões de identificação são utilizados para tipos particulares de micro-organismos, sendo a coloração de Gram do isolado fundamental para permitir que o cartão de teste correto seja utilizado (PINTO et al., 2010).

Dentre os pontos críticos apresentados pelos sistemas acima, pode-se destacar (PINTO et al., 2010):

- A necessidade de colônias puras recentes, ou seja, cujo repique foi feito, no máximo, três dias antes.
- A subjetividade na interpretação dos resultados.
- A rapidez na obtenção dos resultados finais dependerá do sistema utilizado e do micro-organismo sob identificação.

A espectrometria de massa também tem sido utilizada na identificação de micro-organismos. Produtos de decomposição gasosos liberados através do aquecimento de isolados microbianos em vácuo podem ser analisados por espectrometria de massa, que fornecerá espectro característico. Do mesmo modo, células microbianas intactas, quando submetidas à espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) liberam um padrão específico de espécies carregadas. A amostra é incorporada a uma estrutura cristalina de pequenos compostos orgânicos, denominada matriz, e depositada sobre um suporte condutor da amostra. Os cocristais são irradiados com um feixe de laser de nanossegundos, cuja energia causa a decomposição estrutural do cristal irradiado e, com isso, uma nuvem de partículas, a partir da qual os íons são extraídos por um campo elétrico. O espectro gerado pode ser comparado a perfis conhecidos, como forma rápida de identificação (EUROPEAN PHARMACOPOEA, 2013 e JURINKE et al., 2004). Sendo assim, obter-se-á uma identificação e um *score* confiáveis, dependendo da similaridade entre o espectro obtido e a base de dados do equipamento. Alguns micro-organismos, como bactérias Gram-negativas, são facilmente analisados, após semeadura direta da colônia no suporte condutor da amostra. Para a identificação de leveduras e de outros tipos de bactérias, geralmente, há a necessidade de uma pré-extração, que envolve a imersão dos isolados em ácido fórmico a 70%, antes da adição da matriz (THEEL et al., 2012).

Dentre os métodos fenotípicos existem ainda os métodos imunológicos, baseados em reações antígeno-anticorpo, como os ensaios de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) e aqueles baseados nos perfis de ácido graxo dos micro-organismos (PINTO et al., 2010).

A identificação microbiana, através de métodos fenotípicos, fornece informações importantes, as quais permitem que decisões sejam tomadas, considerando os riscos que os produtos oferecem. Além disso, através destes métodos os microbiologistas podem reconhecer mudanças na microbiota ambiental. Em muitas investigações realizadas em laboratórios de controle de qualidade, a identificação fenotípica é suficiente e permite uma avaliação completa, de modo que ações corretivas adequadas sejam sugeridas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

#### 1.6.3.2 Métodos genotípicos

Recentemente, avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de sistemas com base no genótipo de micro-organismos e cujos resultados fornecidos não dependem de variações nas condições de crescimento da célula. Atualmente, técnicas moleculares podem ser usadas para a detecção de patógenos e para a identificação de micro-organismos, em geral (PINTO et al., 2010). Dentre os métodos genotípicos, pode-se citar o MicroSeq<sup>®</sup> (*AppliedBio System*), que é um sistema de identificação genotípica de bactérias e fungos, baseado no gene do rRNA 16S de bactérias e no gene que codifica a região D2 da subunidade maior do rRNA fúngico. O sistema utiliza a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), mas neste caso, não há a necessidade de conhecimento prévio do organismo, uma vez que o sistema utiliza iniciadores (*primers*) universais (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001). Outro método já bastante utilizado é a QPCR (PCR quantitativa, também conhecida como PCR em tempo real), que permite a detecção e a quantificação de traços de diferentes espécies de micro-organismos em produtos de composição complexa. A QPCR é considerada uma das técnicas moleculares mais promissoras da atualidade (FAJARDO et al., 2010).

### 1.7 Preservação de micro-organismos

A utilização contínua de cepas de micro-organismos, para fins experimentais, didáticos ou industriais gerou o desenvolvimento de diversas metodologias de manutenção e preservação de células. Sendo assim, o conhecimento da metodologia mais adequada de

preservação de culturas bacterianas e o acesso a técnicas simples e eficientes, tornou-se de grande valia aos laboratórios de microbiologia (SOLA et al., 2012).

No entanto, considerar somente a sobrevivência do agente não é suficiente. Torna-se necessário considerar a viabilidade e principalmente a escolha de métodos que não promovam a ocorrência de mutações ou variabilidades, que têm reflexo na patogenicidade, virulência ou em características básicas da cultura original. Portanto, considera-se como preservação eficaz aquela capaz de manter o micro-organismo em estado viável, livre de contaminação e sem alterações em suas características fenotípicas e genotípicas originais (SOLA et al., 2012).

Atualmente, existem diversos métodos para a preservação microbiana, com objetivos de preservação por curto, médio e longo prazo (SOLA et al., 2012).

O subcultivo ou passagem de colônias para meios estéreis é o método mais simples para se manter a viabilidade de micro-organismos por curto prazo, e o mais utilizado em bactérias. Porém, a cada repique para uma nova subcultura aumentam as chances de mutação, podendo ocorrer indesejáveis mudanças nas características do micro-organismo (COSTA & FERREIRA, 1991).

Nos últimos anos, a preservação de culturas através do congelamento tem obtido destaque. No entanto, o choque osmótico e lesões de membrana podem gerar perda de viabilidade, devido à formação de gelo intracelular e recristalização (SELWAL et al., 2011). Para proteger os organismos de possíveis danos durante os processos de congelamento, estocagem e descongelamento, agentes crioprotetores são normalmente utilizados. Existem dois tipos de agentes crioprotetores: aqueles que atuam intracelularmente, como glicerol e dimetilsulfóxido; e aqueles que protegem a célula externamente, como sacarose, lactose, glicose, manitol, sorbitol, dextran, pirrolidona e poliglicol. (SOLA et al., 2012).

O congelamento comum se baseia na conservação de organismos a temperaturas relativamente baixas, entre -4 e -20°C, e apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e menos onerosos, por não requerer equipamentos sofisticados, nem mesmo no preparo do material. Além disso, este método oferece segurança adequada ao armazenamento de diversos micro-organismos, por períodos de três meses a dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular. No entanto, ocorre a redução da viabilidade de alguns micro-organismos, em função dos danos causados às células em decorrência da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada. Não deve ser utilizado freezer do tipo “*frost-free*” (livre de gelo), para o congelamento e a preservação de micro-organismos, pois neles ocorrem flutuações de temperatura que podem diminuir ainda mais a viabilidade celular (COSTA & FERREIRA, 1991).



Existem ainda outros métodos utilizados para a preservação de micro-organismos por médio prazo, como a preservação em óleo mineral e a preservação em água esterilizada. Já os métodos mais utilizados para a preservação de micro-organismos por longo prazo são a liofilização, que consiste na conservação de micro-organismos por meio da dessecação rápida de culturas mantidas em estado de congelamento; e a criopreservação, que se baseia na manutenção de materiais a baixas temperaturas ( $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  em freezers) ou ultrabaixas temperaturas ( $-150^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  em containeres de nitrogênio líquido) (SOLA et al., 2012).

## 1.8 **Justificativa**

Conforme discutido anteriormente, diversos riscos podem estar associados ao processo produtivo de medicamentos e, dentre estes, a contaminação microbiana se apresenta como um perigo em potencial. Os contaminantes microbianos podem ser originários de diversas fontes, inclusive, da água utilizada na lavagem dos equipamentos e na formulação dos produtos (MEDEIROS et al., 2011). Diante do acima exposto, percebe-se com clareza a necessidade do conhecimento da diversidade microbiana das cepas circulantes na unidade de produção, através da criação de uma bacterioteca, que poderá auxiliar na elucidação de possíveis fontes de contaminação e de deterioração de sistemas de purificação de água. Apesar da importância do tema acima exposto, não foram encontrados dados na literatura referentes ao tema. No entanto, alguns laboratórios já realizam este tipo de controle, como por exemplo, o laboratório de controle microbiológico do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, unidade da Fiocruz conhecida como Biomanguinhos.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada, dedicado à área de fabricação de medicamentos à base de penicilina, de Farmanguinhos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar microbiologicamente os pontos de coleta de água potável e purificada no período de janeiro a maio de 2013.
- Isolar, identificar, através de MALDI-TOF MS, e manter as espécies microbianas isoladas a partir do referido sistema de água em meio de conservação.
- Criar uma bacterioteca, contendo as informações e características de cada cepa selvagem encontrada.
- Avaliar os micro-organismos encontrados e os potenciais riscos por eles oferecidos ao sistema de água e à qualidade dos produtos.
- Sugerir formas de redução dos riscos encontrados, baseando-se no reconhecimento dos fatores microbianos que podem interferir com a qualidade do produto e/ou processo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise microbiológica da água

Amostras de água (volume = 200 mL) do sistema de geração de água purificada do prédio 40 (área dedicada à produção de medicamentos à base de penicilina) de Farmanguinhos foram coletadas em sacos de amostragem estéreis e analisadas diariamente, com exceção dos finais de semana, no período da manhã, pelo Laboratório de Controle Microbiológico, setor componente da Coordenação de Gestão da Qualidade de Farmanguinhos. Os pontos coletados, indicados nas Figuras 2 e 3, respectivamente, foram denominados SSP40N (ponto de água potável) e GKP40N (ponto de água purificada).

Os micro-organismos foram isolados a partir dos pontos descritos acima, sob fluxo laminar vertical (marca: VECO) de janeiro a maio de 2013. As análises foram realizadas pelos métodos de contagem em placa por profundidade (Figura 6B) e de filtração por membrana (Figura 7), em fluxo laminar horizontal, sob condições assépticas. No método de filtração por membrana foi utilizado equipamento de *manifold* conectado à saída de vácuo, presente no próprio fluxo laminar horizontal (marca: Telstar).

O sistema de água do prédio 40 (marca: GEHAKA) foi sanitizado, mensalmente, com o sanitizante BP 600 (fabricante: IPEL), a base de glutaraldeído, diluído a 2%. As datas de sanitização foram escolhidas de acordo com a programação de produção da área, ou seja, nos períodos de feriados prolongados, em que não houve produção de medicamentos, o sistema de purificação de água foi sanitizado somente após o retorno às atividades de manufatura.

##### 3.1.1 Contagem do número total de micro-organismos mesófilos

O teste de contagem do número total de micro-organismos mesófilos foi realizado nos dois pontos de água coletados e foi executado por metodologia de contagem em placa por método de profundidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O teste se iniciava com a transferência de duas alíquotas de 1 mL da amostra para duas placas de Petri, respectivamente. Em seguida, o meio de cultura ágar R2A (lote: 127869; fabricante: Himedia;

validade: 11/15; composição: vide ANEXO 1), previamente fundido e mantido entre 45 e 48°C, foi adicionado às placas e as mesmas foram homogeneizadas manualmente, realizando-se movimentos circulares “em forma de oito”. As placas foram incubadas em estufa (marca: Fanem) por 5 dias, entre 30 e 35°C. Após este período, o número de colônias de cada placa foi contado, com o auxílio de um contador de colônias (marca: Phoenix) e o resultado foi expresso em UFC/mL, após cálculo da média aritmética das contagens obtidas entre as duas placas.

Na técnica de contagem em placa por método de profundidade muitas vezes é difícil o isolamento das colônias, pois as mesmas crescem sob o ágar. Por isso, para a realização deste trabalho, o teste de contagem do número total de micro-organismos mesófilos foi realizado, em paralelo, por método de filtração por membrana (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Através desta técnica, as colônias cresceram sobre uma membrana de nitrocelulose, o que facilitou o isolamento das mesmas, posteriormente. Por esta metodologia, a análise foi iniciada com a transferência de uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm; 47 mm de diâmetro; fabricante: GVS) para aparelho de filtração, com o auxílio de uma pinça. Uma alíquota de 10 mL da amostra foi transferida ao copo de filtração, com o auxílio de pipeta graduada e o vácuo, então, era ligado. Após a filtração de todo o material, a membrana foi retirada com o auxílio de uma pinça e transferida para placa de Petri contendo o meio de cultura ágar R2A, para que, após a incubação por 5 dias entre 30 e 35°C, fosse realizado o isolamento das colônias obtidas.

No caso do ponto SSP40N, por ser um ponto de água potável, 1 mL de tiosulfato de sódio a 10% (lote: 1101721, fabricante: VETEC; validade: 02/15) foi adicionado a cada 100 mL de água, antes da realização da análise, para que ocorresse a inativação do cloro presente na água.

### 3.1.2 Pesquisa de patógenos

No caso do ponto GKP40N, por ser o mesmo um ponto de água purificada, foram realizadas as pesquisas de coliformes totais, *Escherichia coli* e de *Pseudomonas aeruginosa*, por método de filtração por membrana (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para isso, duas alíquotas de 100 mL da amostra foram filtradas através de membrana de nitrocelulose (0,45 µm; 47 mm de diâmetro; fabricante: GVS): uma das membranas foi transferida para

uma placa de Petri, contendo o ágar VRB (lote: 122473; fabricante: Himedia; validade: 09/15; composição: vide ANEXO 1) e a outra membrana foi transferida para uma placa de Petri, contendo o ágar Cetrimide (lote: 063704; fabricante: Himedia; validade: 07/14; composição: vide ANEXO 1). O ágar VRB foi utilizado para a pesquisa de coliformes totais e de *E. coli* e o ágar Cetrimide foi utilizado para a pesquisa de *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas entre 30 e 35°C, por 48 h. Após a incubação, as placas foram verificadas quanto à presença de colônias características de coliformes totais, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Sabe-se que as colônias de coliformes totais e de *E. coli*, no ágar VRB, crescem vermelhas, rodeadas por zonas de precipitação avermelhadas, com diâmetro de 1 a 2 mm. Colônias de *P. aeruginosa* produzem um pigmento amarelo-esverdeado e fluorescência sob luz UV no ágar Cetrimide (MERCK, 2000).

No caso do ponto SSP40N, por ser o mesmo um ponto de água potável, foi realizada apenas a pesquisa de *E. coli*. Para isso, apenas 100 mL da amostra foram filtrados em membrana de nitrocelulose (0,45 µm; 47 mm de diâmetro; fabricante: GVS), sendo a mesma transferida para placa de Petri, contendo o ágar ENDO (lote: 100252; fabricante: Himedia; validade: 11/15; composição: vide ANEXO 1). Esta placa foi incubada em estufa (marca: Biomatic) entre 40 e 45°C, por 24 h. Após a incubação, a placa foi verificada quanto à presença de colônias características de *E. coli*. Sabe-se que colônias de *E. coli* são vermelhas e apresentam permanente brilho metálico, no ágar ENDO (MERCK, 2000).

### 3.2 Obtenção, isolamento e congelamento das cepas microbianas

Após a leitura dos resultados, as placas que apresentaram crescimento microbiano foram separadas. As colônias foram selecionadas visualmente, conforme as características morfológicas, como tamanho e cor, e isoladas em ágar TSA (lote: 1159699; fabricante: DIFCO; validade: 02/16; composição: vide ANEXO 1), através da técnica de semeadura por esgotamento, com o auxílio de alça descartável estéril. As placas foram incubadas entre 30 e 35°C por 1 a 5 dias. As colônias foram caracterizadas visualmente, numeradas, fotografadas e submetidas à coloração de Gram. Em seguida, os esfregaços foram analisados ao microscópio (marca: Leica), para a classificação das células e registro das características das mesmas. Em seguida, uma alçada de cada colônia foi transferida para criotubo, contendo 1 mL de *skim milk* a 10 % (lote: 0314482; fabricante: DIFCO; validade: 10/15; composição: vide ANEXO 1) +

glicerol 20 a 30% (lote: 43700; fabricante: Dinâmica; validade: 02/15). Cada criotubo foi identificado com etiqueta, contendo um número sequencial, o número de passagens da cepa e a data do congelamento. Os criotubos foram mantidos em congelador (marca: Cònsul; modelo: 280 Class; n° de série: AMH 0400090), entre -10 e -25°C.

### 3.3 Identificação das cepas

O Laboratório de Controle Microbiológico de Farmanguinhos não possui equipamento para a identificação de micro-organismos. Por isso, este trabalho foi feito em parceria com a doutoranda Luciane Medeiros, pesquisadora de Biomanguinhos (Fiocruz), que estava em Braga, Portugal, na Universidade do Minho, terminando o seu doutorado.

As cepas mantidas em congelador foram repicadas para tubo, contendo 5 mL de caldo TSB (caldo caseína soja - lote: 118342; fabricante: Himedia; validade: 07/15; composição: vide ANEXO 1) e incubadas entre 30 e 35°C, por 24 a 48 h para a proliferação e reativação das mesmas. Em seguida, novo repique foi realizado, desta vez para criotubo contendo TSA inclinado. As condições de incubação foram mantidas. Após o período de incubação, os criotubos permaneceram em refrigerador (marca: Cònsul), entre 2 e 8°C, até o envio para a Universidade de Minho.

Finalmente, após recebimento, as cepas foram transferidas, individualmente, para tubos contendo caldo Luria Bertani (LB) (lote: 112218; fabricante: Himedia; validade: 04/15); composição: vide ANEXO 1) e incubadas entre 30 e 35°C, por 1 a 3 dias, até que fosse observada turvação. Em seguida, foi realizado o repique das mesmas para placas de Petri contendo ágar TSA. As placas foram incubadas entre 30 e 35°C, por 1 a 3 dias, até que fosse observado o crescimento de colônias e, então, as mesmas foram identificadas em VITEK MS (marca: BioMérieux), conforme as instruções do fabricante. Para isso, as colônias foram transferidas para lâminas próprias para o equipamento, as quais possuem 48 orifícios (*spots*), sendo que em dois orifícios é obrigatória a transferência de cepa padrão de *E. coli* (ATCC 8739). Após a transferência de todas as colônias, pingou-se uma gota da matriz, composta por CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) para a fixação das mesmas à lâmina, que foi, então, inserida no equipamento para a identificação das cepas.

### **3.4 Criação da bacterioteca de Farmanguinhos**

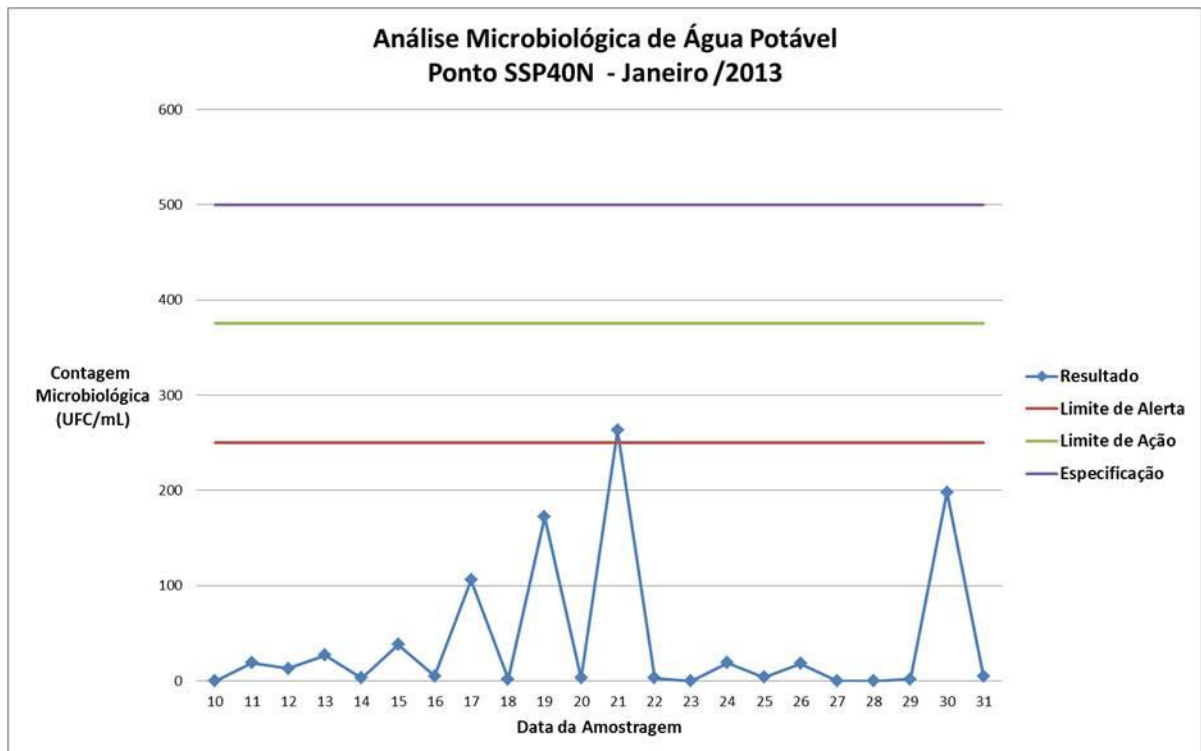
Todas as informações acerca da caracterização e da identificação de cada cepa foram registradas em um caderno de capa dura e do mesmo modo em uma planilha de Excel, a qual foi salva em disco externo. As fotografias referentes a cada colônia foram salvas no mesmo local, já que o diretório compartilhado de Farmanguinhos não comportou o tamanho dos arquivos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise microbiológica dos pontos de água potável e purificada

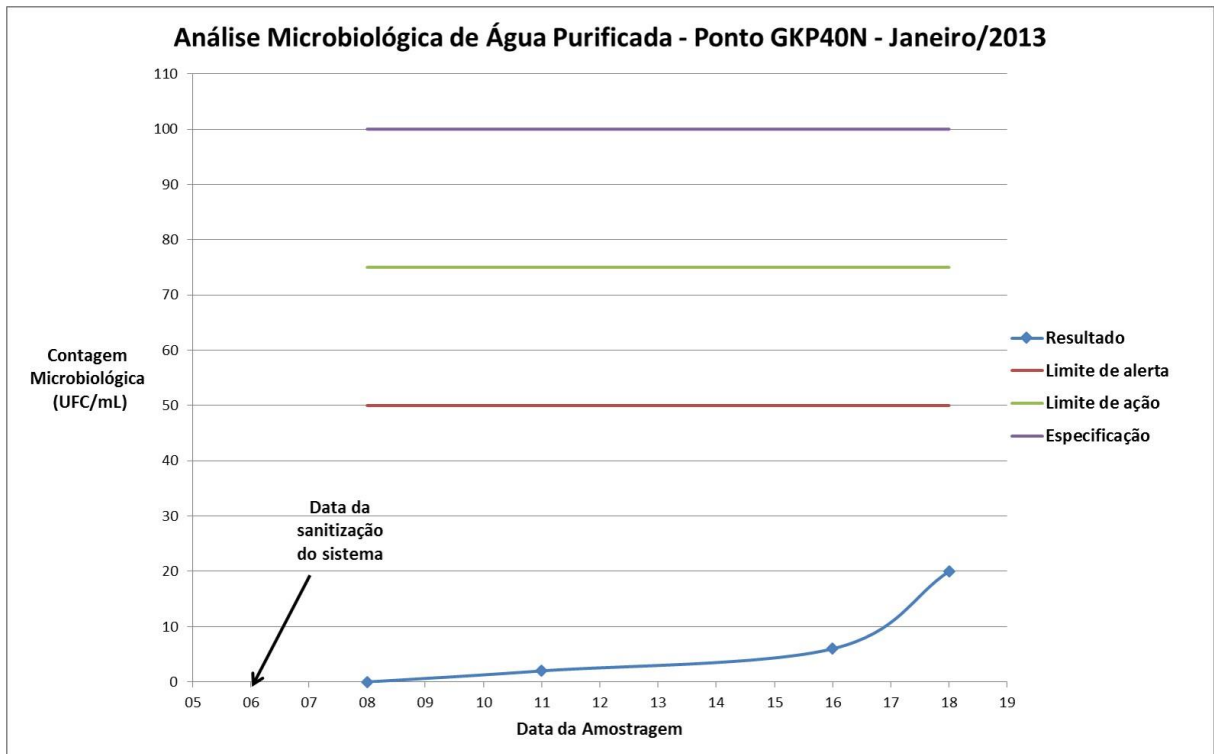
As figuras 8 a 17 abaixo demonstram os resultados obtidos a partir da análise microbiológica (Contagem total de micro-organismos mesófilos) por metodologia de contagem em placa por profundidade dos pontos de água potável (SSP40N) e de água purificada (GKP40N) no período de janeiro a maio de 2013. As figuras 9, 11, 13, 15 e 17, referentes ao ponto GKP40N apresentam também as datas em que o sistema de água do prédio 40 de Farmanguinhos foi sanitizado.

Não foram observados resultados acima da especificação para ambos os pontos, sendo a especificação para análise microbiológica de água potável igual a 500 UFC/mL e para água purificada igual a 100 UFC/mL.

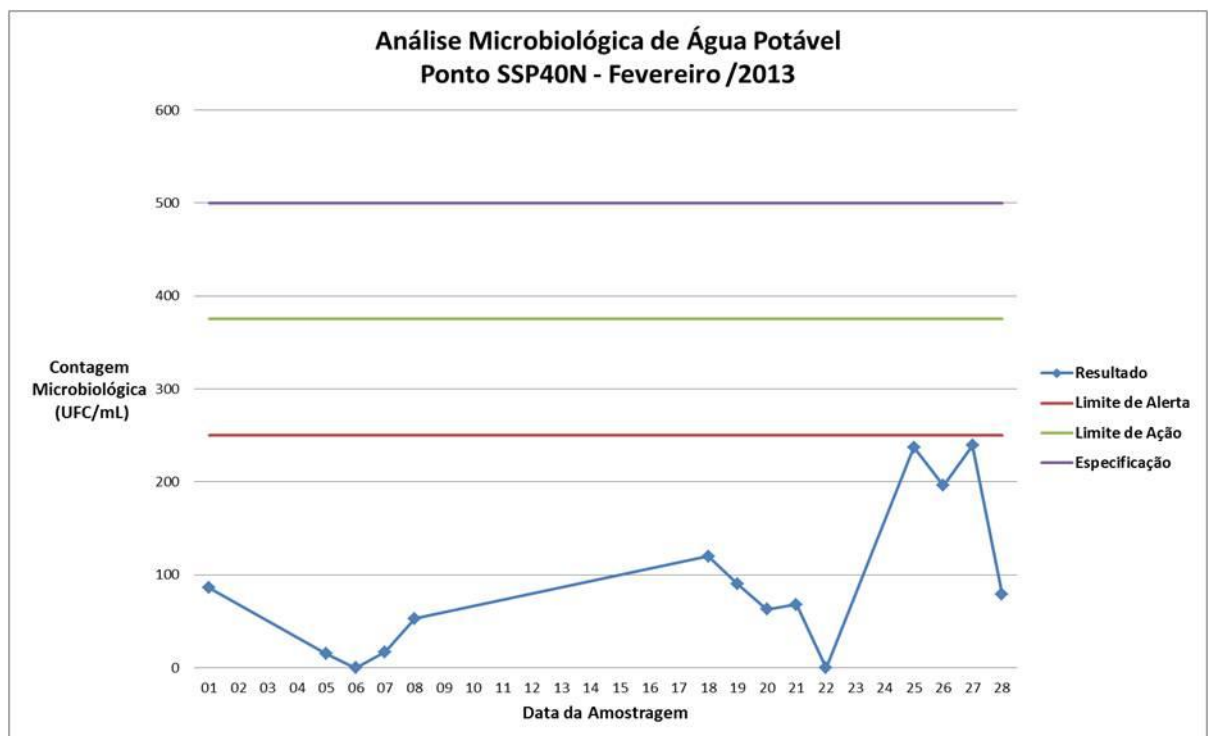


**Figura 8:** Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em janeiro de 2013.

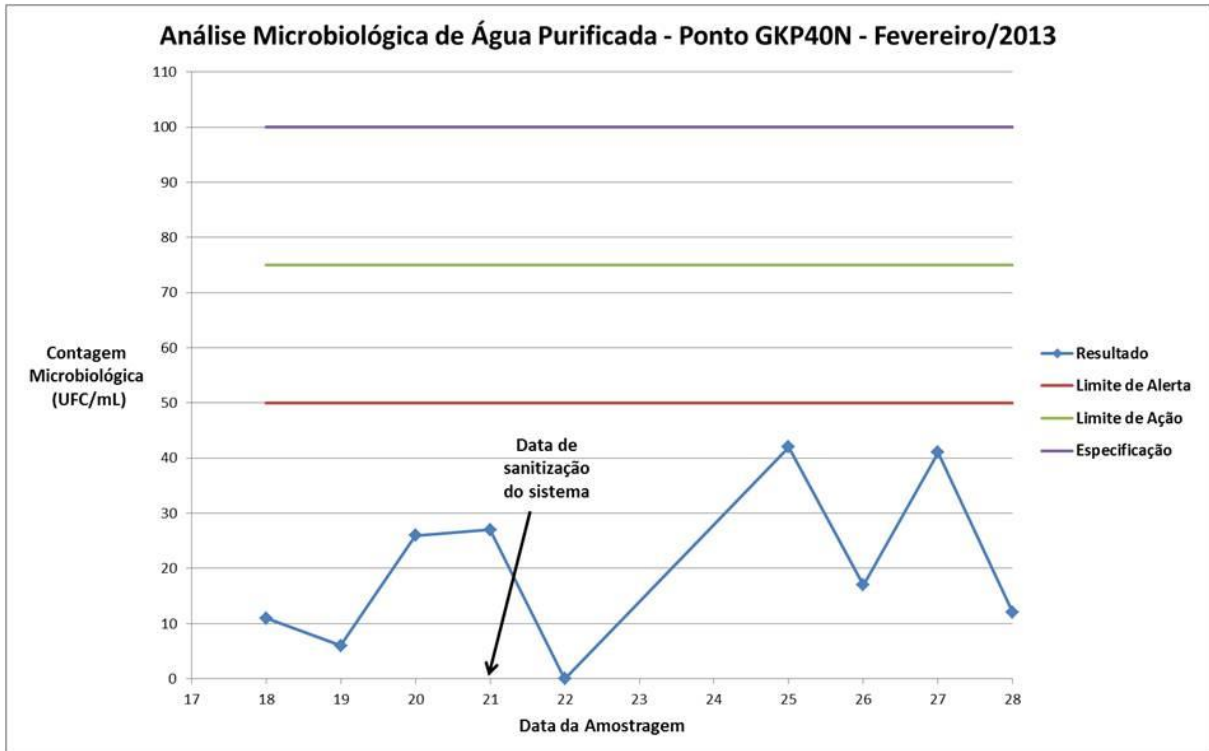




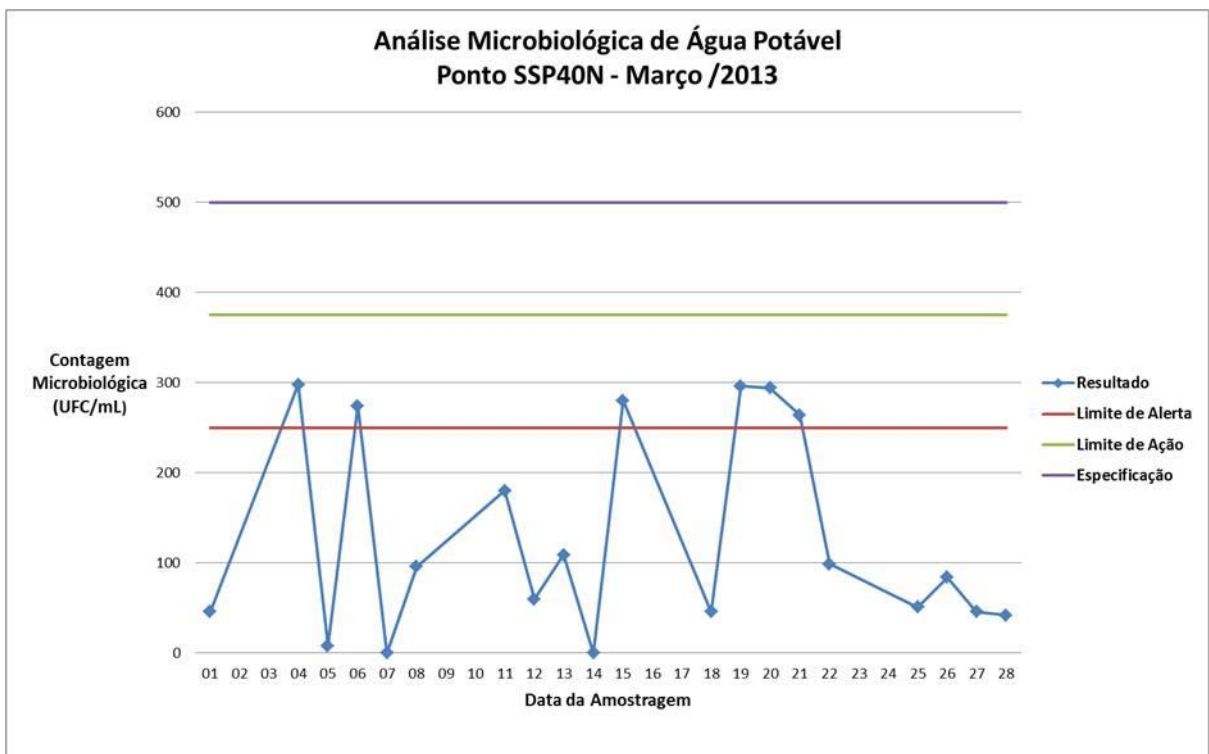
**Figura 9:** Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em janeiro de 2013.



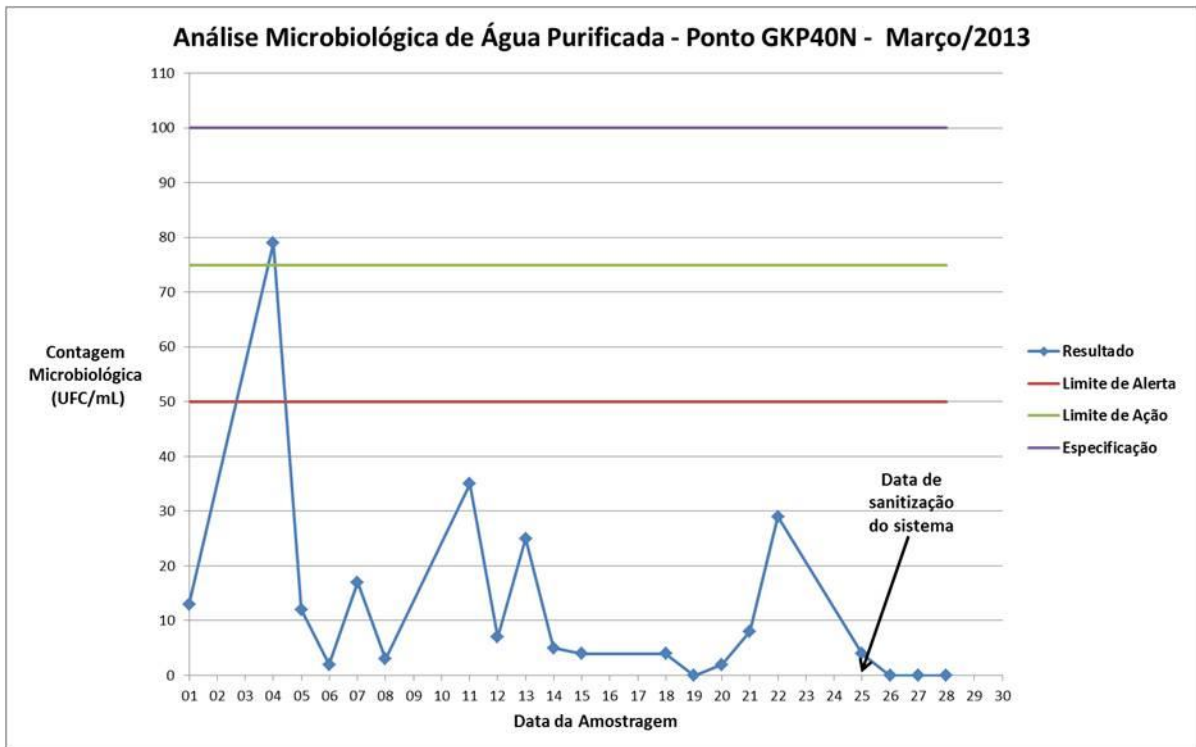
**Figura 10:** Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em fevereiro de 2013.



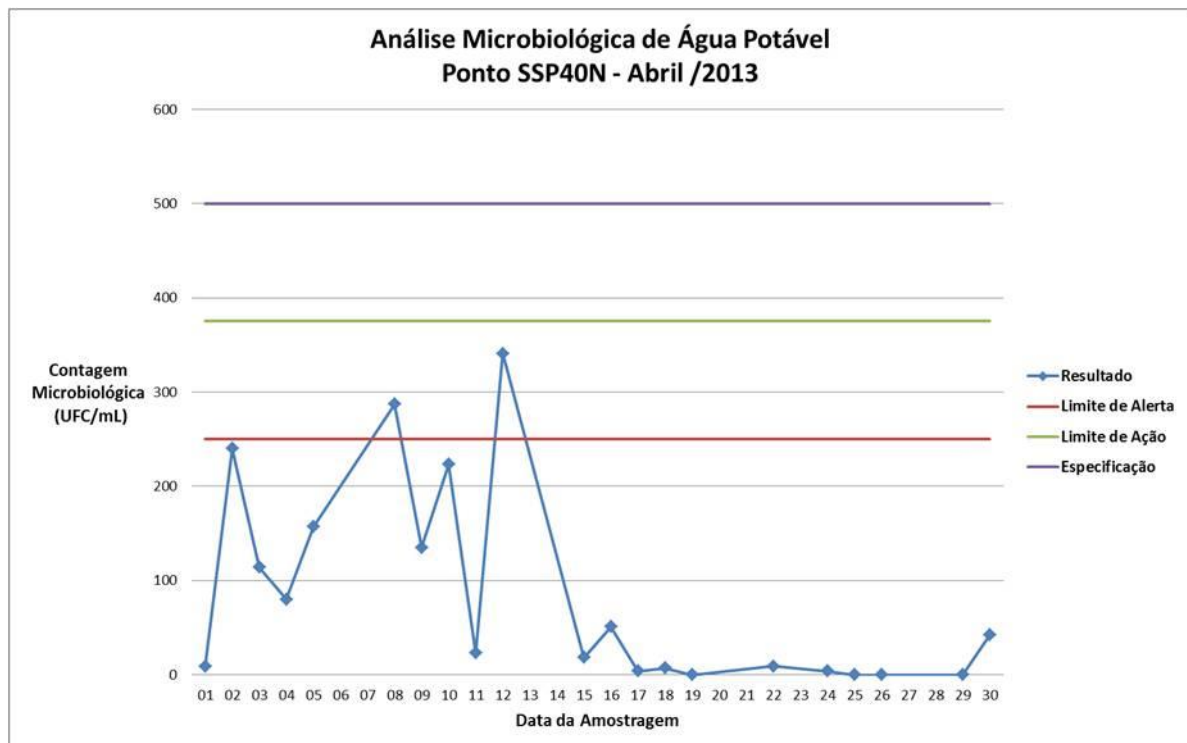
**Figura 11:** Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em fevereiro de 2013.



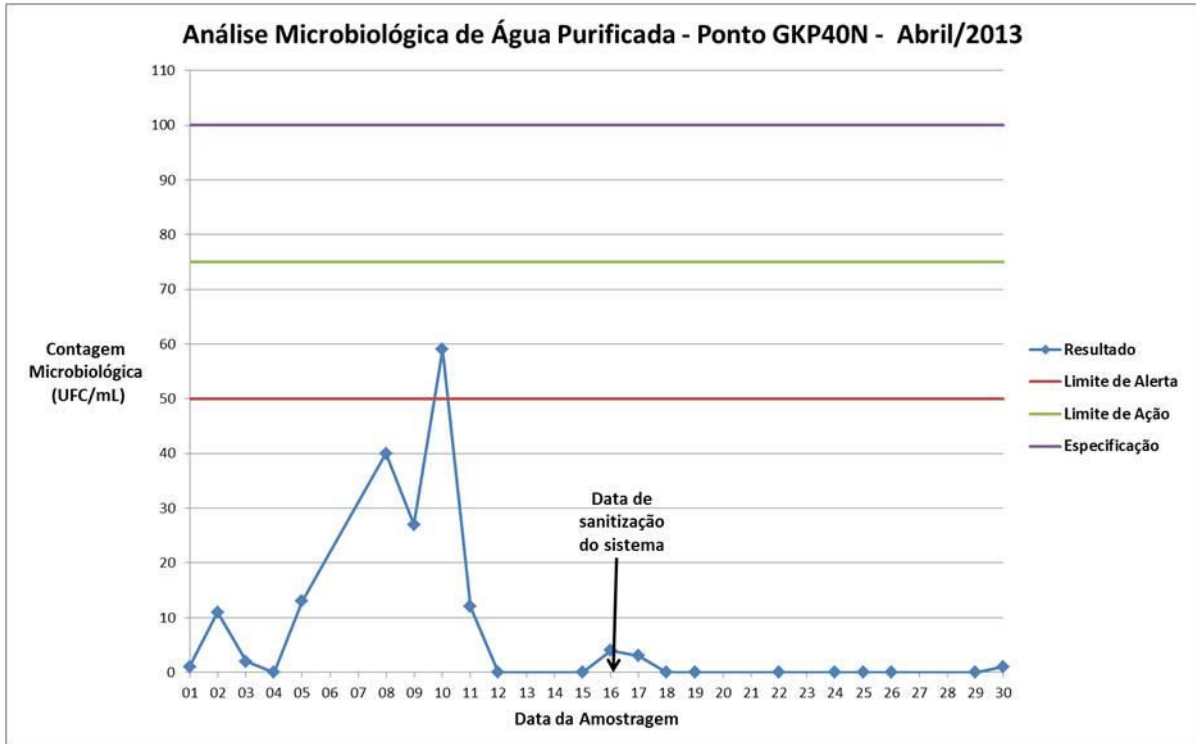
**Figura 12:** Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em março de 2013.



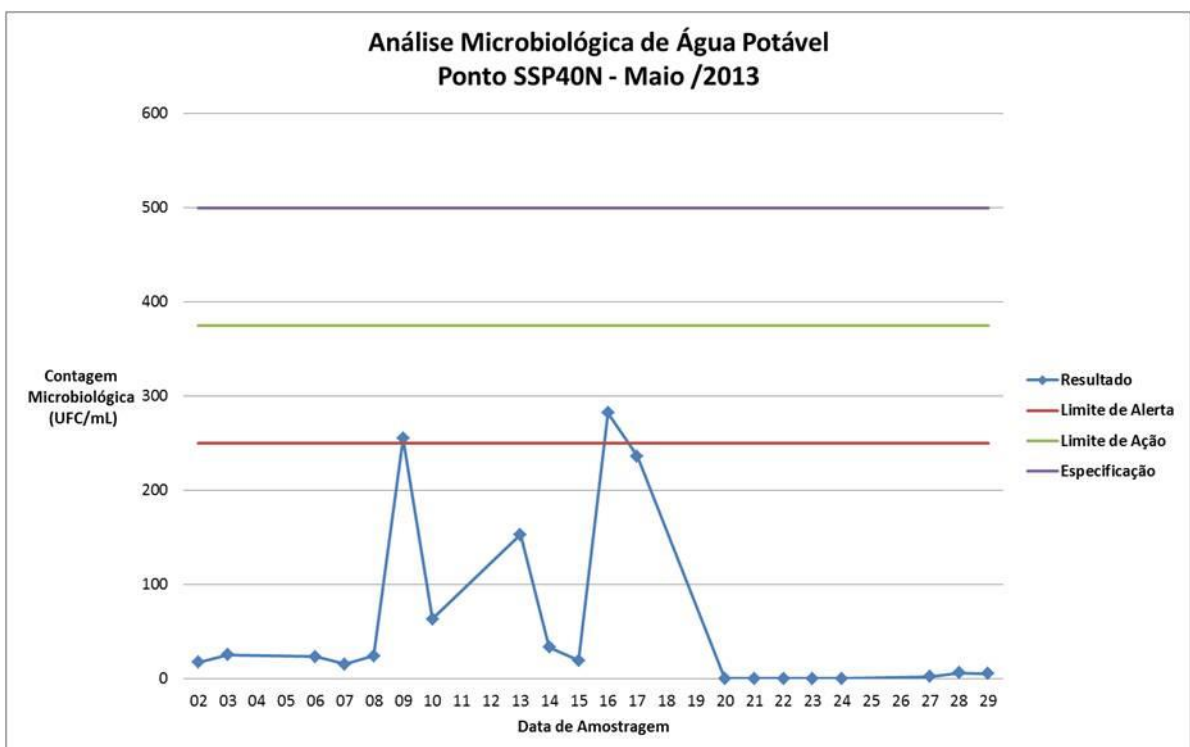
**Figura 13:** Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em março de 2013.



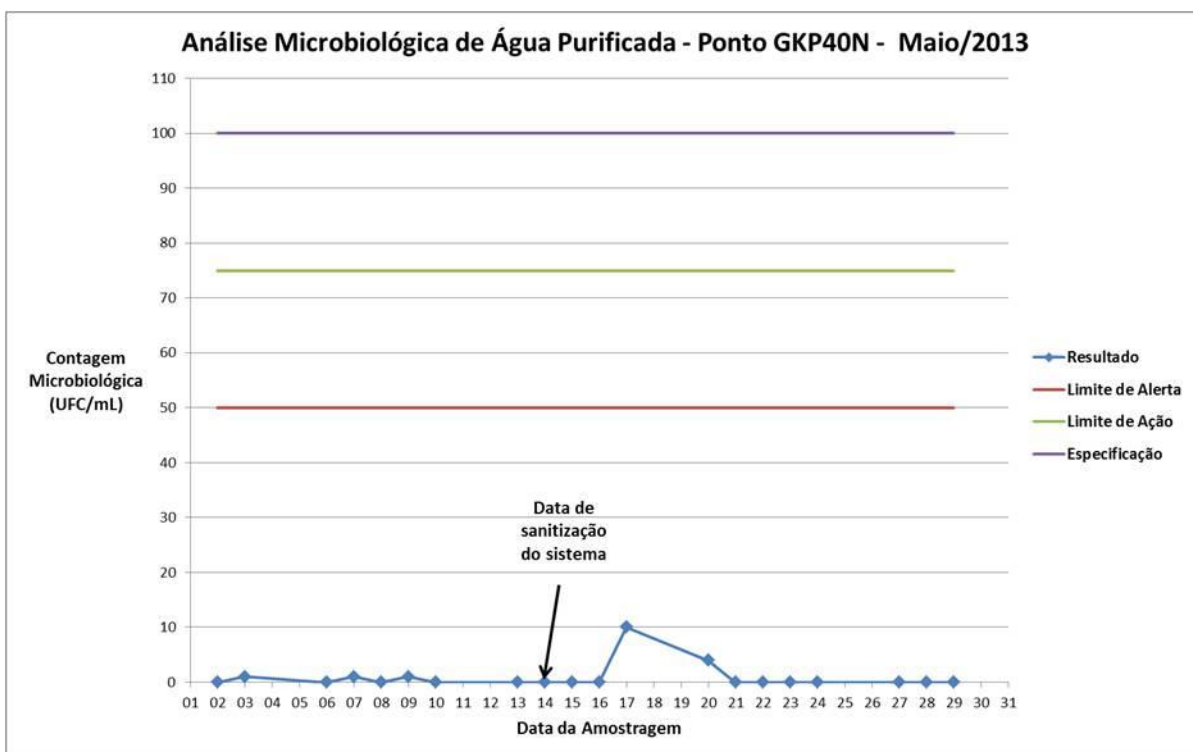
**Figura 14:** Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em abril de 2013.



**Figura 15:** Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em abril de 2013.



**Figura 16:** Resultados das análises microbiológicas do ponto SSP40N realizadas em maio de 2013.



**Figura 17:** Resultados das análises microbiológicas do ponto GKP40N realizadas em maio de 2013.

O limite de alerta representa uma faixa que, quando excedida indica que o processo pode ter se desviado da sua condição normal de operação. Constitui-se em advertência e não necessariamente exige ação corretiva. Os resultados referentes ao ponto SSP40N (água potável) ultrapassaram o limite de alerta apenas uma vez em janeiro (Figura 8), seis vezes em março (Figura 12) e duas vezes em abril (Figura 14) e maio (Figura 16). Já o ponto GKP40N (água purificada) apresentou resultados acima do limite de alerta apenas uma vez nos meses de março (Figura 13) e abril (Figura 15), sendo que em março este resultado ultrapassou, inclusive, o limite de ação, o qual, quando excedido, indica que o processo se desviou de sua faixa de operação normal. Exceder o limite de ação sinaliza a necessidade de ação corretiva, como a sanitização do ponto e a coleta da água durante três dias seguidos, para análise microbiológica, a fim de garantir que o processo retornou à sua faixa de operação normal. O ponto de coleta foi sanitizado no mesmo dia (04/03) e nos três dias seguintes, a água foi coletada deste ponto, apresentando resultados abaixo do limite de alerta (as datas de sanitização dos pontos de coleta não estão indicadas nos gráficos, apenas as datas de sanitização total do sistema).

Ainda nos mês de março, pode-se observar que a elevação na contagem da água potável (Figura 12) foi acompanhada pela ultrapassagem do limite de ação do ponto de água purificada (Figura 13). Entretanto, nos demais dias em que a quantificação de micro-

organismos a partir do ponto de água potável ultrapassou o limite de alerta, o sistema de água purificada apresentou eficiência, já que o mesmo fato não foi observado nos resultados obtidos a partir do ponto GKP40N.

Pode-se observar, ainda, que no mês de abril (Figura 15), após a sanitização do sistema de purificação de água, os resultados obtidos a partir da análise microbiológica de micro-organismos mesófilos do ponto GKP40N permaneceram abaixo do detectável, o que sugere a eficiência do sanitizante. Já no gráfico referente às análises do mês de maio (Figura 17), observa-se um pico no dia 17 que, embora abaixo do limite de alerta, pode ter ocorrido, devido ao aumento das contagens obtidas a partir do ponto de água potável (Figura 16).

A sanitização do sistema demonstrou influência sobre os resultados da análise microbiológica do ponto de água purificada GKP40N nos meses de fevereiro a abril, já que após a sanitização, houve queda na quantificação de micro-organismos mesófilos.

De modo geral, a elevação nas contagens microbianas obtidas a partir do ponto de água purificada (GKP40N) acompanhou a elevação nas contagens obtidas a partir da água que alimenta o sistema (ponto SSP40N). Mesmo assim, pode-se afirmar que o sistema de purificação de água aparentou eficiência na eliminação dos contaminantes provenientes da água potável, já que a maior parte dos resultados obtidos permaneceu abaixo do limite de alerta.

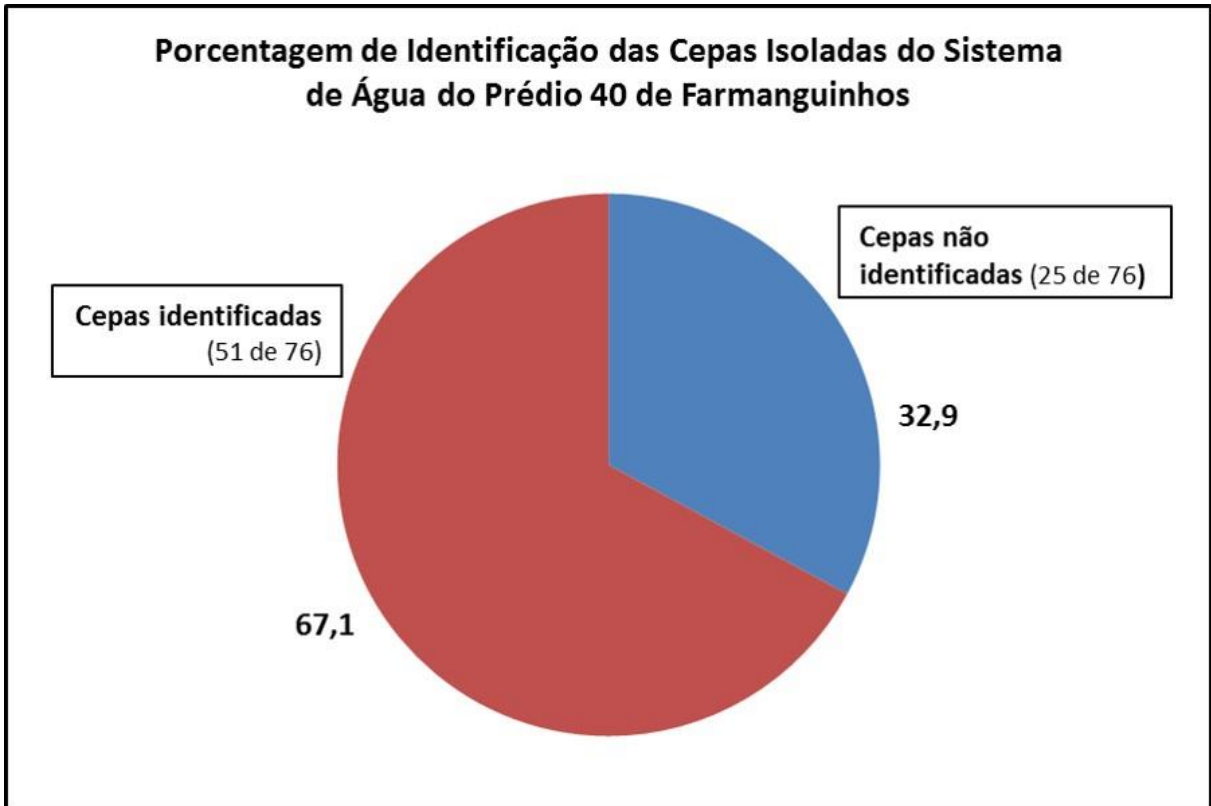
As pesquisas de patógenos realizadas entre os meses de janeiro e maio de 2013 a partir dos pontos SSP40N e GKP40N apresentaram como resultado ausência/100 mL, por isso não estão representadas nos gráficos acima.

#### **4.2 Cepas isoladas e identificadas a partir dos pontos de água potável e purificada**

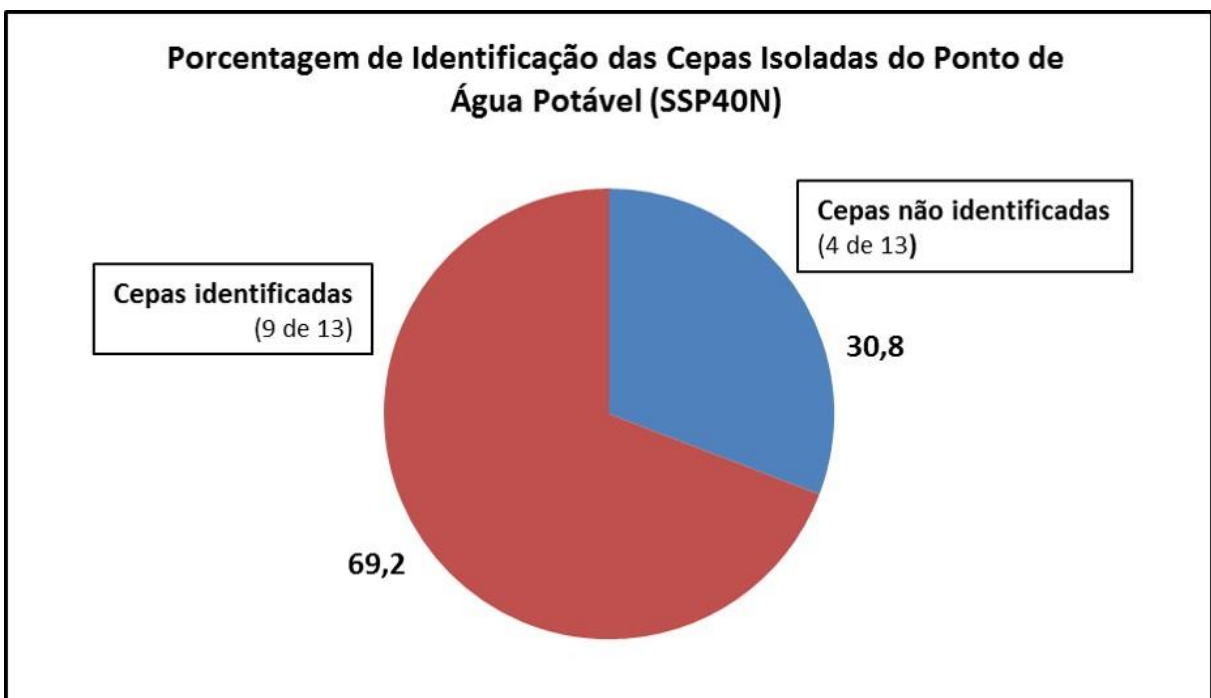
No total, foram isoladas 157 cepas dos pontos de água potável (SSP40N) e purificada (GKP40N) do sistema de água de Farmanguinhos, que foi objeto deste estudo. No entanto, nem todas as cepas foram recuperadas. Do total de 157 espécies bacterianas enviadas para identificação na Universidade do Minho, em Portugal, 76 cepas foram recuperadas (63 foram isoladas do ponto GKP40N e 13 do ponto SSP40N).

A figura 18 a seguir demonstra o percentual de cepas identificadas em relação ao total de cepas recuperadas. As figuras 19 e 20 demonstram o percentual de cepas identificadas em relação ao total de cepas recuperadas, a partir do isolamento dos pontos SSP40N e GKP40N,

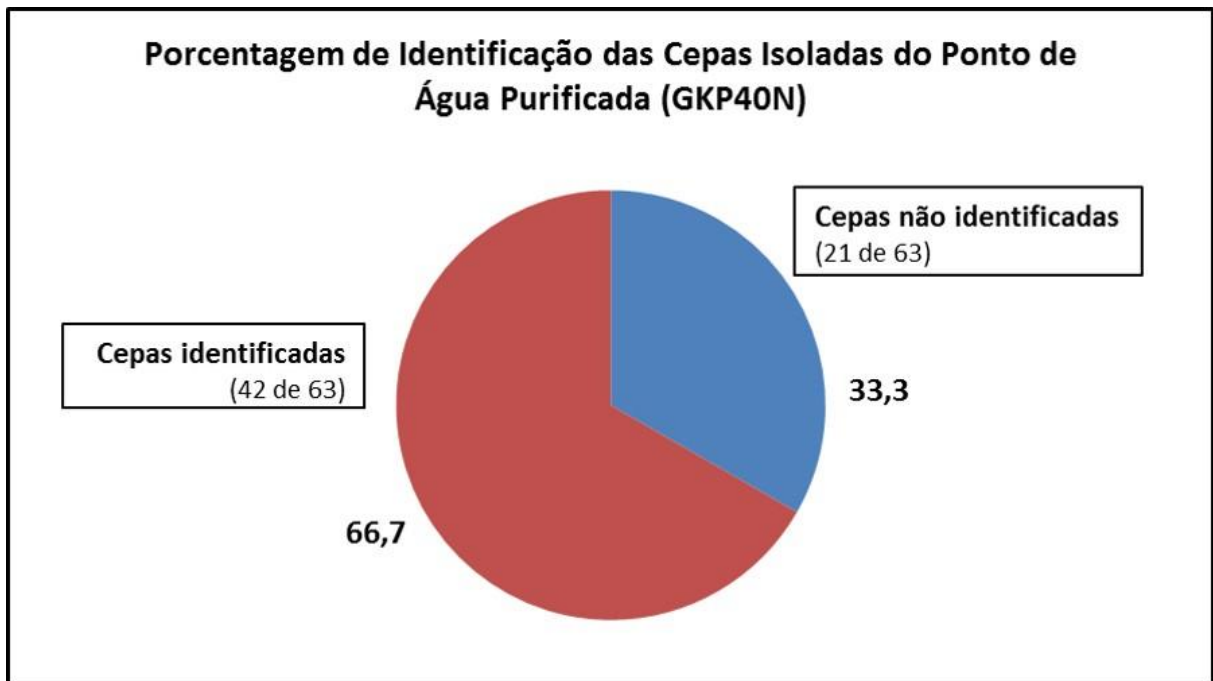
respectivamente. Já as figuras 21 e 22 demonstram quais espécies foram encontradas em cada ponto e a frequência de isolamento das mesmas, respectivamente.



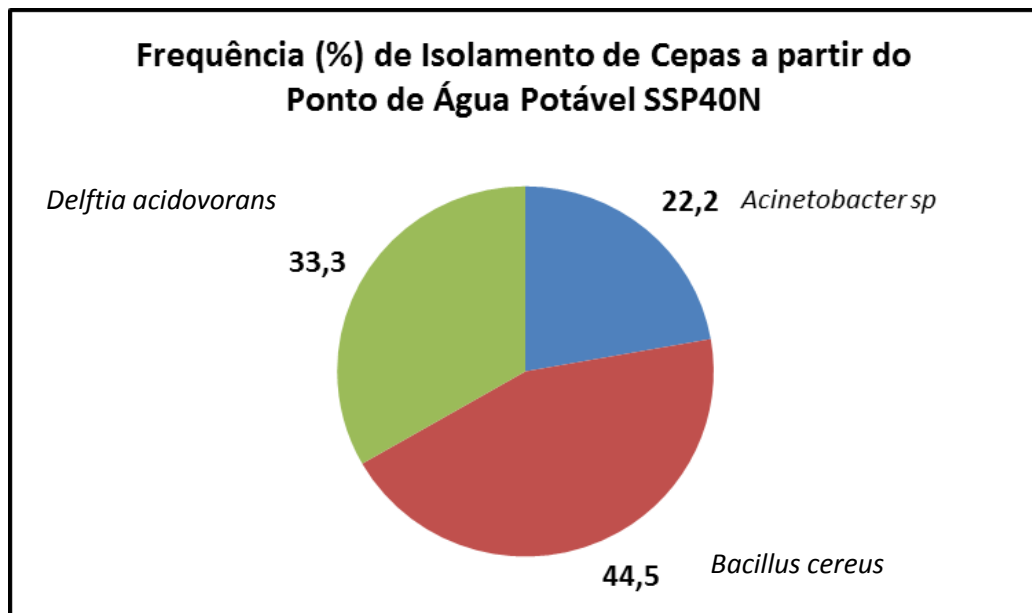
**Figura 18:** Porcentagem de identificação das cepas isoladas do sistema de água de Farmanguinhos.



**Figura 19:** Porcentagem de identificação das cepas isoladas do ponto SSP40N.

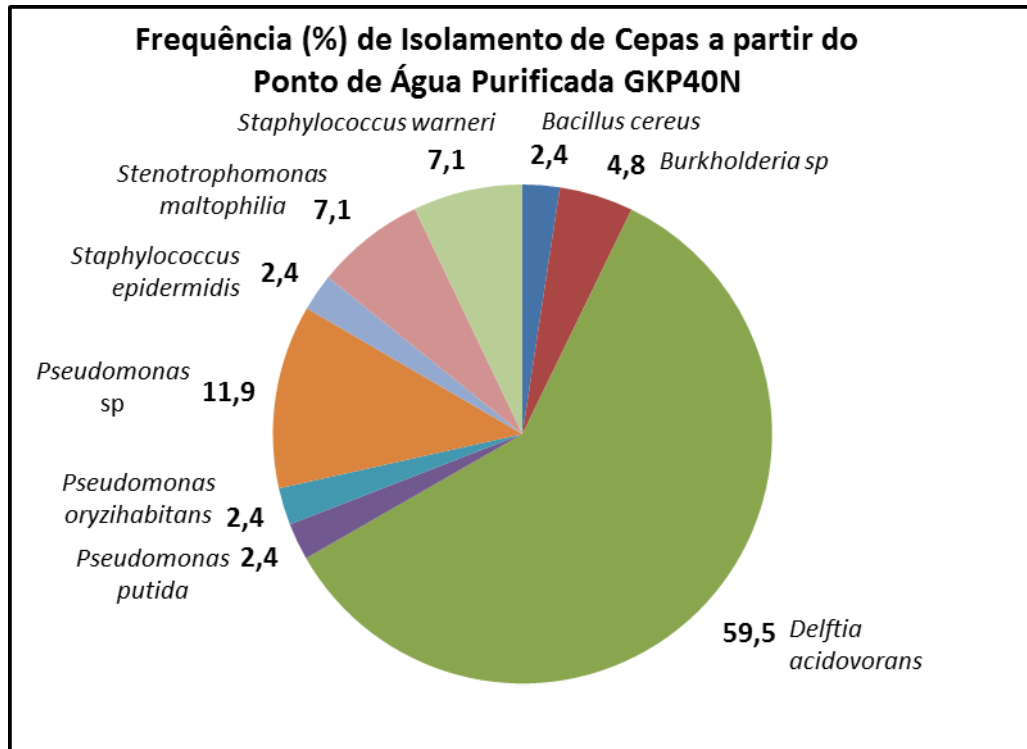


**Figura 20:** Porcentagem de identificação das cepas isoladas do ponto GKP40N.



**Figura 21:** Cepas identificadas a partir do ponto SSP40N e as respectivas frequências de isolamento.





**Figura 22:** Cepas identificadas a partir do ponto GKP40N e as respectivas frequências de isolamento.

A partir das figuras acima, pode-se observar que do número total de cepas recuperadas (76), 67,1% foram identificadas pelo equipamento VITEK MS e 32,9% não foram identificadas pela base de dados do equipamento (Figura 18). Considerando-se cada ponto separadamente, 66,7% das cepas recuperadas após isolamento a partir do ponto GKP40N foram identificadas e 33,3% não foram identificadas (Figura 20). No caso do ponto SSP40N, 69,2% das cepas recuperadas foram identificadas e 30,8% delas não foram identificadas pelo VITEK MS (Figura 19).

Quanto ao gênero de bactérias isoladas, apenas três foram identificadas a partir do ponto SSP40N: *Bacillus cereus*, *Delftia acidovorans* e *Acinetobacter sp*. As duas primeiras foram encontradas em 44,5% e 33,3% dos isolados, respectivamente, enquanto o gênero *Acinetobacter sp* foi encontrado em 22,2% dos isolados (Figura 21).

No caso do ponto GKP40N, foi encontrada uma diversidade microbiana maior: sete espécies (Figura 22). Para alguns isolados, a base de dados do equipamento VITEK MS apresentou apenas o gênero, como pode ser observado para *Burkholderia sp* e *Pseudomonas sp*, que estiveram presentes em 4,8% e 11,9% dos isolados, respectivamente. A espécie bacteriana mais encontrada foi *Delftia acidovorans*, que foi identificada em 59,5% dos isolados. Outras espécies também foram encontradas, mas em menor número, como:

*Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus warneri*, ambas presentes em 7,1% dos isolados; *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas oryzihabitans* e *Pseudomonas putida*, estiveram presentes em apenas 2,4% dos isolados.

As fotografias das culturas em placa das espécies bacterianas isoladas do sistema de purificação de água de Farmanguinhos são apresentadas no ANEXO 2.

## 5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a água consiste em meio de crescimento que, embora não rico, apresenta variações em suas características microbianas (PINTO et al., 2010). Este estudo avaliou a diversidade microbiana presente em sistema gerador de água purificada da planta de produção de penicilínicos da unidade de Farmanguinhos – Fiocruz. Para isto, as amostras de água coletadas a partir do ponto de entrada (ponto de água potável - SSP40N) e do ponto de saída do sistema (ponto de água purificada - GKP40N) foram analisadas microbiologicamente quanto à contagem de micro-organismos mesófilos e quanto à presença de patógenos. As colônias isoladas e recuperadas após envio para a Universidade do Minho foram submetidas à identificação, através de equipamento VITEK MS.

No presente estudo, utilizou-se o meio de cultura ágar R2A, no teste de contagem total de micro-organismos mesófilos, já que amostras de água são, normalmente, pobres em nutrientes, especialmente amostras de água purificada. Atualmente, há dois tipos de meios de cultura disponíveis para análise microbiológica tradicional: os meios de cultura ricos em nutrientes como o PCA (ágar para contagem) e os meios de cultura pobres em nutrientes, como o ágar R2A. Os primeiros são utilizados para o isolamento de bactérias heterotróficas; os últimos são mais indicados para o isolamento de bactérias oligotróficas de crescimento lento, ou bactérias que requerem baixos níveis de nutrientes para crescerem otimamente. Algumas bactérias oligotróficas são capazes de crescer em meios ricos em nutrientes e vice-versa, mas isto não é uma verdade absoluta. Ambos os tipos de meios de cultura podem ser utilizados concomitantemente durante a validação de um sistema de água, assim como periodicamente, para se avaliar em qual dos dois meios de cultura a microbiota normal do sistema de água seria melhor recuperada (UNITES STATES PHARMACOPEIA, 2013). Assim, pode-se inferir que, se no presente estudo tivesse sido utilizado um meio de cultura rico em nutrientes, como o PCA ou o TSA, concomitantemente ao R2A, um número maior de espécies bacterianas poderia ter sido recuperado.

Na análise microbiológica de água foi utilizada membrana de 0,45 µm, no teste de filtração por membrana, pois este é o diâmetro de poro sugerido para este tipo de teste, mesmo na análise microbiológica de água para injetáveis. Por não se tratar, no presente estudo, de uma filtração esterilizante, mas sim da análise de sistema de água que atende à produção de medicamentos não-estéreis, em Farmanguinhos, optou-se por manter a utilização de membrana de 0,45 µm. Conforme a UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013, a

utilização de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , para filtração esterilizante, surgiu a partir do isolamento de *Brevundimonas diminuta* a partir de um produto que havia sido submetido à filtração esterilizante, utilizando filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ . Estudos posteriores revelaram que um percentual de células de *B. diminuta* seria capaz de penetrar através de filtros contendo poro de diâmetro igual a 0,45  $\mu\text{m}$ . Dados mais recentes sugerem, inclusive, a capacidade de *B. diminuta* e outras espécies bacterianas, como *Listeria monocytogenes* e *Hydrogenophaga pseudoflava* de penetrar através de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Vale ressaltar que nenhuma destas espécies bacterianas possui diâmetro menor que 0,22  $\mu\text{m}$ . Alguns autores sugerem que a passagem das bactérias através destes filtros pode ser influenciada pela alteração de atributos físico-químicos dos fluidos a serem filtrados, como viscosidade, osmolaridade e condutividade, o que consequentemente pode alterar as características físico-químicas dos filtros e das bactérias, impactando em sua passagem (LEE et al., 2010 e UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Portanto, diante do acima exposto, em estudos posteriores, onde o objetivo também seja a avaliação da diversidade microbiana ou, até mesmo, da contagem total de micro-organismos encontrados em um sistema de água, seria interessante a utilização de membrana de poro igual a 0,22  $\mu\text{m}$ , ao invés da membrana de poro 0,45  $\mu\text{m}$ , para se garantir o isolamento de uma diversidade maior de bactérias presentes no referido sistema.

Do total de cepas isoladas (157), apenas 76 foram recuperadas após envio para a Universidade do Minho. Passaram-se quatro meses entre o repique das cepas para criotubos contendo TSA inclinado e o recebimento das mesmas na Universidade do Minho, Portugal. Durante este período, antes do envio propriamente dito, as cepas permaneceram dois meses em refrigerador (2 a 8°C), aguardando a realização dos trâmites burocráticos para o envio. Devido ao longo período, possivelmente, muitos isolados esgotaram os nutrientes presentes nos meios de cultura, produzindo metabólitos tóxicos, o que os levou à morte. Além disso, trata-se aqui de isolados provenientes de sistema de purificação de água, extremamente pobre em nutrientes, o que pode causar a diminuição da viabilidade das células bacterianas, devido às alterações físicas e queda metabólica, tornando-as mais difíceis de cultivar.

Do total de cepas recuperadas (76), apenas 32,9 % não foram identificadas pela base de dados do equipamento VITEK MS, enquanto 67,1% foram identificadas. Sabe-se que os isolados clínicos foram os propulsores do desenvolvimento e uso de sistemas de identificação microbiana (PINTO et al., 2010). Apesar da evolução do uso desses sistemas para outras finalidades, como isolados provenientes da indústria farmacêutica, ainda há muita fragilidade nas bases de dados destes equipamentos para tipos particulares de micro-organismos. Esta

pode ser a razão de 32,9% das cepas recuperadas não terem sido identificadas pelo referido sistema. No entanto, a base de dados do equipamento VITEK MS permite a inserção de novos micro-organismos, o que é uma grande vantagem, pois torna possível a adequação da base de dados à microbiota do ambiente fabril analisado. Além disso, para a qualificação do equipamento, os métodos moleculares baseados na amplificação e sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S são utilizados como métodos de referência (VERRROKEN et al., 2010), o que torna a identificação fornecida pelo equipamento mais confiável, já que a taxonomia bacteriana se baseia neste tipo de metodologia.

A espécie microbiana mais encontrada, dentre o total de isolados, no presente estudo, foi *Delftia acidovorans*: bastonete Gram-negativo, aeróbio estrito e, geralmente, móvel (SAN et al., 2012). A espécie foi isolada tanto do ponto de água potável (frequência de 33,3%), quanto do ponto de água purificada (frequência de 59,5%). A maior fonte exógena de contaminação de águas para uso farmacêutico é a água de alimentação, ou seja, a água potável utilizada. Uma grande variedade de micro-organismos, especialmente bactérias Gram-negativas, pode estar presente, o que poderá comprometer as etapas de purificação posteriores (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Em 1999, evidências filogenéticas e fenotípicas geraram a remoção da então espécie *Comamonas acidovorans* do gênero *Comamonas*, para introduzi-la em um novo gênero, denominado *Delftia* (UBALDE et al., 2012). *D. acidovorans* é uma espécie bacteriana não-fermentadora, que apresenta resultado positivo nos testes de oxidase e catalase e é muito encontrada no solo e na água (SAN et al., 2012). Dados da literatura sugerem que esta espécie apresenta resistência a agentes antimicrobianos, através da formação de um biofilme efetivo (DYNES et al., 2007). A presença de *D. acidovorans* pode representar um risco em potencial ao sistema de água de Farmanguinhos, já que a espécie está associada à corrosão de tubulações de sistemas de água (SAN et al., 2012).

Revestimentos de zinco são largamente utilizados na proteção de componentes de aço contra a corrosão, como em tubulações de sistemas de água. A co-deposição de outros metais é uma das maneiras de aumentar as propriedades de depósitos de zinco relacionadas à corrosão. Além disso, revestimentos de liga níquel-zinco possuem alta resistência à corrosão e melhores características mecânicas que o zinco puro ou outros revestimentos de liga com zinco (SAN et al., 2012 e SULLIVAN, et al., 2010). Os biofilmes, contendo células microbianas e seus produtos metabólicos, incluindo substâncias poliméricas extracelulares, criam um ambiente propício à corrosão de metais, devido à presença de oxigênio dissolvido,

nutrientes, gradiente de pH e temperatura e pressão adequados (SAN et al., 2012 e SHERAR et al., 2011).

SAN e colaboradores (2012) demonstraram que *D. acidovorans* desempenha um importante papel na corrosão de revestimentos de liga níquel-zinco, em ensaios laboratoriais, pois gera alterações eletroquímicas entre a superfície de liga revestida e o meio de cultura líquido utilizado. Todas as técnicas eletroquímicas demonstraram que ao final da fase exponencial de crescimento bacteriano, quando a atividade metabólica é máxima, a atividade corrosiva dos revestimentos de níquel-zinco aumentou notavelmente, devido à presença de metabólitos bacterianos. Consequentemente, o acúmulo de produtos corrosivos causou a degradação dos revestimentos de liga. Este tipo de revestimento está presente nas tubulações de água potável de Farmanguinhos.

A espécie bacteriana *Bacillus cereus* também foi isolada dos pontos de água potável (frequência de 44,5%) e purificada (frequência de 2,4%). O gênero *Bacillus* inclui bastonetes Gram-positivos amplos, aeróbicos ou anaeróbios facultativos, formadores de esporos e cujas células são dispostas em cadeias. *Bacillus cereus* é uma espécie saprofítica prevalente em ambientes como solo, água, ar e vegetação, mas pode ainda crescer em alimentos e produzir enterotoxinas ou toxinas eméticas, capazes de causar distúrbios alimentares em humanos (BROOKS et al., 2010 e DROBNIIEWSKI, 1993). Entretanto, esta espécie bacteriana é utilizada em formulações farmacêuticas, para tratar infecções intestinais causadas por bactérias patogênicas, pois exerce atividade reguladora da flora intestinal humana (SANCHEZ et al., 2009).

O gênero *Acinetobacter* foi isolado somente do ponto de água potável SSP40N (frequência de 22,2%). A espécie mais isolada do gênero, *Acinetobacter baumannii*, é um patógeno oportunista, transmitido pela água e comumente encontrado em água potável clorada. Estes patógenos podem ser encontrados tanto na forma livre plantônica, quanto associados a biofilmes e aderidos a superfícies internas de tubulações (SHIH & LIN, 2010). O gênero *Acinetobacter* é composto por bactérias aeróbias Gram-negativas, largamente distribuídas no solo e na água, mas que ocasionalmente, podem ser encontradas na pele, nas mucosas, em secreções e em ambientes hospitalares (BROOKS et al., 2010).

O gênero *Pseudomonas* também foi isolado a partir do ponto de água purificada GKP40N, com frequência de 16,7%. Este gênero é composto por bastonetes Gram-negativos, não-fermentadores, considerados patógenos oportunistas e encontrados facilmente na natureza, em ambientes como: solo, água, plantas, animais e material orgânico em decomposição. Dados da literatura demonstram que as espécies destes gêneros são

encontradas com frequência em sistemas de tratamento de água, o que demonstra uma adaptação a ambientes com baixa concentração de nutrientes e ampla faixa de temperatura. *Pseudomonas* sp são a principal causa de endotoxinas e biofilmes em sistemas de purificação de água, em geral (PENNA et al., 2002 e MAZZOLA et al., 2006).

A espécie bacteriana *Stenotrophomonas maltophilia* (frequência de 7,1%) também é um patógeno oportunista comumente encontrado em água potável clorada. O nome *S. maltophilia* é o mais aceito para o micro-organismo anteriormente denominado *Pseudomonas maltophilia* e *Xantomonas maltophilia*. *S. maltophilia* é um bastonete Gram-negativo de vida livre amplamente distribuído pela natureza e tem sido associado com frequência a infecções em pacientes imunocomprometidos e/ou pacientes submetidos à terapia com antibióticos (BROOKS et al., 2010 e SHIH & LIN, 2010).

Outro gênero isolado a partir do ponto GKP40N, *Burkholderia* (frequência de 4,8%), é bastante encontrado em amostras de sistemas de água de diferentes indústrias farmacêuticas no Brasil. Os membros deste gênero são bastonetes Gram-negativos, móveis, aeróbios e amplamente distribuídos pela natureza. Assim como as espécies de *Pseudomonas*, os membros do gênero *Burkholderia* são importantes causadores de infecção hospitalar. Podem ser transmitidos pelo contato direto ou através de fontes de contaminação ambiental (MINOGUE et al., 2013).

Além de micro-organismos que vivem naturalmente em ambientes aquáticos, foram isoladas do ponto GKP40N duas espécies de *Staphylococcus*: *S. warneri* (frequência de 7,1%) e *S. epidermidis* (frequência de 2,4%). Estes micro-organismos são classificados como cocos Gram-positivos. Como estas bactérias têm como habitat natural a microbiota da pele e a mucosa de humanos (BROOKS et al., 2010), a presença dos mesmos entre os isolados pode alertar para uma possível contaminação de fonte humana do ambiente, na coleta e/ou processamento das amostras de água.

Como já foi dito anteriormente, as bactérias são capazes de colonizar superfícies reversível ou irreversivelmente e se multiplicarem, formando comunidades altamente especializadas. Os biofilmes podem disseminar os micro-organismos em sistemas de purificação de água, contribuindo assim para um aumento nos números de partículas, de bactérias e dos níveis de TOC (MAZZOLA et al., 2006). A contaminação microbiana pode afetar todo o processo de fabricação farmacêutica, inclusive o produto final, já que a água purificada é utilizada na lavagem de equipamentos e na fabricação de medicamentos líquidos não-estéreis. As espécies de bastonetes Gram-negativos isoladas neste estudo estão bastante

associadas a contaminações em tubulações de sistemas de água, como já foi demonstrado acima.

A eficiência dos sistemas de purificação de água depende de sua correta e frequente manutenção, com a reposição dos elementos filtrantes e da sanitização com produtos químicos específicos. A sanitização consiste em remover contaminantes e materiais incrustados no interior dos sistemas de purificação de água e deve ser realizada com regular frequência (DIAS, 2007).

Agentes antimicrobianos, como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético são utilizados com frequência para controlar o crescimento e a formação de biofilmes. No entanto, o desenvolvimento da resistência antimicrobiana permite a proliferação do biofilme, que representa um desafio crescente para diversos tipos de indústrias, como a farmacêutica. Diversas espécies de *Pseudomonas*, por exemplo, apresentam resistência a vários agentes sanitizantes. Quando há exposição a fatores de estresse ambientais, como deficiência de nutrientes ou presença de substâncias tóxicas, biofilmes bacterianos sofrem mudanças estruturais e bioquímicas, o que permite a sua sobrevivência. Este fenômeno torna-se evidente em uma subpopulação que suspende temporariamente a sua reprodução, porém retorna a proliferar, quando a causa do estresse é removida. Há vários possíveis mecanismos causadores deste fenômeno, como: fatores genéticos básicos, penetração restrita dos antimicrobianos ao biofilme e diminuição das taxas de crescimento (DEQUEIROZ & DAY, 2007, DYNES et al., 2007 e MAZZOLA et al., 2006).

O sistema de água de Farmanguinhos é sanitizado mensalmente com BP 600 (sanitizante a base de glutaraldeído) diluído a 2%. Os filtros do sistema são substituídos a cada três meses e a membrana de osmose reversa é substituída a cada três anos. Nas figuras 14, 15 e 16 pode-se observar uma redução considerável do número total de micro-organismos mesófilos, após a sanitização do sistema. Isto demonstra que o sanitizante utilizado parece estar sendo eficiente na manutenção da contagem de micro-organismos mesófilos dentro do limite especificado. No entanto, a diversidade microbiana encontrada demonstra que alguns micro-organismos com características corrosivas para a tubulação de água, como *D. acidovorans* parecem circular no referido sistema, além de outros micro-organismos caracterizados como patógenos oportunistas e que estão associados à formação de biofilmes em sistemas de água, como *Pseudomonas* sp, *Burkholderia* sp e *Stenotrophomonas maltophilia*. Estes dados sugerem que o sanitizante utilizado não está sendo capaz de eliminar os micro-organismos citados, apesar de atuar de maneira versátil contra as células bacterianas, pois tem como alvo a parede celular, grupos tiol, grupos amino e enzimas contendo grupos –



SH (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Dados da literatura demonstram que o glutaraldeído, devido ao seu tamanho molecular, não é volátil e não penetra a membrana de osmose reversa adequadamente, o que limita a sua utilidade. Este sanitizante é tipicamente usado em concentrações de 0,5 a 2% (PINTO et al., 2010)

O sistema de água estudado está sendo substituído por outro semelhante, porém de maior capacidade e um pouco mais complexo que o anterior, também da marca GEHAKA®. O novo sistema possui três membranas de osmose reversa e módulo de eletrodeionização contínuo, o qual é responsável pela redução da condutividade da água gerada. O tanque de armazenamento de água purificada tem capacidade para armazenamento de 1.300 litros de água. Além disso, o novo sistema possui quatro pontos de coleta de água purificada no *loop*, um ponto de coleta no tanque de armazenamento e um ponto de coleta na saída da osmose reversa. A tubulação do novo sistema é constituída por aço inox (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2011).

Com base nos resultados obtidos, é possível sugerir algumas ações, de forma que o novo sistema se mantenha íntegro por mais tempo, já que o fornecedor oferece apenas 12 meses de garantia para quaisquer defeitos de fabricação por parte dos materiais e equipamentos fornecidos, a partir da data de partida do mesmo (FARMANGUINHOS/GEHAKA, 2011); e para que a água purificada por ele gerada apresente ainda melhor qualidade do que aquela gerada pelo sistema estudado.

Sistemas de água podem ser submetidos tanto à sanitização térmica, quanto à sanitização química. A sanitização térmica pode ser periódica ou contínua, o que compreende a recirculação intermitente de água pelo sistema a temperaturas entre 65°C e 80°C. A sanitização térmica é eficaz para impedir a proliferação de micro-organismos em biofilmes, porém não é eficaz para eliminar biofilmes já estabelecidos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Por isso, uma das ações propostas seria a realização de sanitização térmica periodicamente, alternando com o rodízio de sanitizantes químicos, para eliminar biofilmes jovens e maduros.

Os métodos de sanitização química utilizam agentes oxidantes, como compostos halogenados, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido peracético ou a combinação de alguns deles. Compostos halogenados são eficazes, porém difíceis de drenar. Já os compostos como peróxido de hidrogênio, ozônio e ácido peracético são capazes de oxidar as bactérias e os biofilmes, através da formação de peróxidos reativos e de radicais livres (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

As bactérias aeróbias possuem a enzima catalase, capaz de quebrar o peróxido de hidrogênio muito rapidamente, porém, as concentrações de sanitização utilizadas, normalmente, são capazes de superar esta defesa. Este composto não é estável em termos de temperatura, logo seu uso se limita a temperaturas que não excedam 25°C. O peróxido de hidrogênio tem sido utilizado para sanitização de sistemas de água em concentrações de 3 a 10%, com tempo de contato de diversas horas e deve ser acrescido de zinco e ferro, que funcionam como estabilizantes (PINTO et al., 2010). Dados da literatura mostram a utilização de misturas de peróxido de hidrogênio com ácido peracético, no combate a biofilmes bacterianos (MAZZOLA et al., 2006).

O ácido peracético é mais adequado para sistemas de água se misturado a outros oxidantes, para potencialização da sua atividade (ex: Divosan Forte, sanitizante comercial que possui ácido peracético a 15%). Para a utilização do ozônio é necessária a sua adição contínua durante a sanitização, devido à meia-vida curta do composto, que demonstra eficácia significativa na remoção de biofilmes jovens; se a espessura do biofilme estiver desenvolvida, a remoção será apenas parcial. Por esta razão, o ozônio tem sido utilizado de forma contínua (PINTO et al., 2010 e UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Portanto, para uma sanitização mais eficaz, aproveitando as vantagens de cada um, seria interessante o rodízio de sanitizantes, de forma a minimizar também a resistência microbiana. No entanto, torna-se necessário um estudo prévio, antes da implementação desta proposta para avaliar a viabilidade financeira da mesma.

De acordo com a Farmacopeia americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013), os sanitizantes são potentes agentes biocidas utilizados em altas concentrações, agindo sobre baixas concentrações de micro-organismos, os quais, normalmente, não estão proliferando ativamente, logo a pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência não é tão significativa. Portanto, caso o rodízio de sanitizantes não seja possível no sistema de água de Farmanguinhos, seria interessante que, pelo menos, periodicamente, o sanitizante utilizado fosse submetido a teste de desafio frente aos micro-organismos mais isolados do sistema de água.

Sugere-se também que seja utilizado mais de um tipo de meio de cultura (o R2A – pobre em nutrientes e o PCA, rico em nutrientes), durante um período de tempo específico, como um mês, na análise de micro-organismos mesófilos totais para se avaliar qual deles seria mais adequado para a recuperação dos micro-organismos presentes no sistema de água de Farmanguinhos.

Outra ação proposta seria a utilização de luva estéril, pelos operadores, no momento da sanitização e no momento da coleta da amostra, e pelos analistas no momento da análise microbiológica. Atualmente, utiliza-se luva de procedimento embebida em álcool a 70%, mas sabe-se que a luva estéril confere proteção maior à amostra. Como já foi dito, a presença de *S. warneri* e *S. epidermidis* pode indicar contaminação humana, já que estes micro-organismos fazem parte da microbiota da pele humana. O monitoramento periódico das luvas dos operadores e dos analistas seria interessante, para eliminar a possibilidade desta contaminação.

Diante do acima exposto, torna-se clara a necessidade de aquisição de um equipamento de identificação microbiana de micro-organismos pelo Laboratório de Controle Microbiológico de Farmanguinhos, de modo a facilitar a continuidade deste estudo e também a realização de estudos posteriores. O referido laboratório utilizou durante longo período, em sua rotina, galerias para ensaios bioquímicos, cuja leitura é realizada visualmente. Este sistema é simples de ser executado, porém a interpretação dos resultados é subjetiva (PINTO et al., 2010). Além disso, os laboratórios oficiais tem seu sistema de compras regido pela lei 8666/93, que estabelece uma série de procedimentos administrativos legais para a aquisição na administração pública, que se caracterizam pela rigidez, o que gera na prática um longo período para a compra de insumos, reagentes e equipamentos.

Muitas vezes, as galerias citadas demoravam quase dois anos para serem entregues, desde o pedido inicial até o recebimento. Como estas galerias e seus reagentes oferecem prazo de validade curto, quando chegavam ao laboratório, já estavam próximos ao vencimento, permanecendo o laboratório desabastecido durante longo período. A solução neste caso seria, por exemplo, o aluguel de equipamento de identificação fenotípica por sistema de comodato e um contrato de manutenção preventiva do equipamento, onde já constasse o abastecimento constante dos insumos necessários à utilização do mesmo. O laboratório de controle microbiológico de Biomanguinhos (FIOCRUZ), já utiliza este tipo de contrato, com sucesso.

## 6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir com este estudo que o sistema de purificação de água de Farmanguinhos dedicado à produção de penicilínicos está sendo eficaz para manter a contagem de micro-organismos mesófilos dentro dos limites especificados. No entanto, alguns micro-organismos estão sendo capazes de resistir ao processo de sanitização utilizado, como: *Burkholderia* sp, *Delftia acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas oryzihabitans*.

A espécie microbiana mais frequente, *Delftia acidovorans*, foi isolada tanto do ponto de coleta de água potável quanto do ponto de água purificada, logo se pode concluir que a fonte de origem deste micro-organismo é o abastecimento de água potável. *D. acidovorans* está associada a processos de biocorrosão e à formação de biofilmes bastante eficazes, o que significa que a espécie seja de difícil eliminação.

Não foram encontrados patógenos indicadores de contaminação fecal nos pontos de água analisados. Porém, espécies de *Pseudomonas*, importante patógeno oportunista, foram isoladas do ponto de água purificada. Estes micro-organismos formam biofilmes difíceis de serem eliminados e desenvolvem com facilidade resistência a uma série de agentes antimicrobianos. Além disso, duas espécies do gênero *Staphylococcus* foram isoladas do sistema de água, o que pode indicar a ocorrência de contaminação humana.

O sistema de geração de água purificada, o qual foi objeto deste estudo, está sendo substituído por um sistema de água ainda mais robusto e com maior capacidade de armazenamento da água purificada gerada. A fim de se minimizar a formação de biofilmes, de se garantir a integridade do sistema durante um maior tempo de uso e, principalmente, de que a água purificada gerada tenha melhor qualidade, ações diversas podem ser propostas para o novo sistema de água, como o rodízio de sanitizantes químicos, a inclusão da sanitização térmica como prática de rotina, a utilização de luvas estéreis por parte dos operadores e dos analistas e o monitoramento, pelo menos semanal, das luvas, para se avaliar quais espécies de micro-organismos são recorrentes. No entanto, para que esta avaliação seja possível, faz-se necessária a aquisição de um equipamento de identificação microbiana por parte do Laboratório de Controle Microbiológico de Farmanguinhos, para que se conheça a microbiota presente não somente nos sistemas de água purificada de Farmanguinhos, mas também nas áreas produtivas. Deste modo, torna-se mais fácil a identificação de possíveis fontes de contaminação ambiental, de matérias-primas e de produtos acabados. É importante que os

micro-organismos isolados dos sistemas de água e das áreas produtivas sejam catalogados e conservados, para serem posteriormente utilizados em ensaios de desafio de sanitizantes, desafio de conservantes e na validação de metodologias analíticas. Deste modo, os resultados obtidos refletirão melhor a realidade, já que serão utilizadas, não somente cepas padrão, mas principalmente, cepas circulantes no ambiente das áreas fabris.

## REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. **MicroSeq® microbial identification system**. Product bulletin: Microbial identification. USA: Applied Biosystems, 2001. Disponível em: <<http://www.microbialid.com/PDF/MicroSeq.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 13.
- BOHUS, V., TÓTH, E.M.; SZÉKELY, A.J. et al. Microbial investigation of an industrial ultrapure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. **Water Research**, v. 44, p. 6124-6132, 2010.
- BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-42.
- BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 abr. 2010. Seção I, p. 94-110.
- BRASÍLIA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Qualidade para Sistemas de Purificação de Água para Uso Farmacêutico**. Brasília, 2013. 28 p. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5619ea004e5c1e4091c9ddd762e8a5ec/guia\\_purificacao\\_de\\_agua.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5619ea004e5c1e4091c9ddd762e8a5ec/guia_purificacao_de_agua.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 05 mar. 2013.
- BROOKS, G.F., CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S. et al. **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. 25. ed. USA: The McGraw-Hill Companies, 2010. 832 p.
- COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. Preservação de micro-organismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.
- DEQUEIROZ, G.A.; DAY, D.F. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and Hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 794-802, 2007.
- DIAS, F.N. **Avaliação da eficácia da sanitização de um sistema de purificação de água. Esterilização de artigos médicos, dissipação residual do óxido de etileno e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como indicado de controle do processo**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- DOMINGUES, V.O., TAVARES, G.D; STUKER, F. et al. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: Comparação entre duas metodologias. **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n. 1, p 15-19, 2007.
- DROBNIOWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and Related Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

DYNES, J.J., REMA, T.; LAWRENCE, J.R. et al. STXM and SR-IR analysis of *Delftia acidovorans* biofilms exposed to chlorhexidine. **Canadian Light Source**, v. 104, p. 104-105, 2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA ONLINE. 7. ed. - Supplement. 7.8. ed. 2013. Disponível em: <<http://online.pheur.org/EN/entry.htm>>. Acesso em 15 dez. 2013.

FAJARDO, V.; GONZALEZ, I.; ROJAS, M. et al. Review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 408-421, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm/](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm/)>. Acesso em: 05 mar. 2012.

FARMANGUINHOS/FIOCRUZ. Farmanguinhos - Instituto de Tecnologia em Fármacos. 2009. Disponível em: [http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=76](http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=76). Acesso em: 28 fev. 2013.

FARMANGUINHOS/GEHAKA. Descritivo Operacional. **Sistema de Água PW**: Descritivo Operacional. Nº DOC: 29952-DO-PD-007, 2012.

FARMANGUINHOS/GEHAKA. Requerimento do Usuário. **Sistema de Água Purificada - Prédio 40**: Especificações Técnicas. Nº DOC: 029952-RU-PD-001, 2011.

FLORJANIC, M.; KRISTL, K. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, p. 16–22, 2011.

FLORJANIC, M.; KRISTL, J. Investigation of ozone disinfection effect on planktonic and biofilm microorganisms in purified water in dynamic laboratory and industrial environment. **Farm Vest**, n. 61, p. 205–211, 2010.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁMACOS. **Relatório de Gestão**: Ciclo 2013. 2013.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P. et al. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v. 27, p. 710-730, 2010.

JIMENEZ, L., SMALLS, S.; IGNAR, R. Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 259-263, 2000.

JOFRE, J.; BLANCH, A.R. Feasibility of methods based on acid nucleic amplification techniques to fulfill the requirements for microbiological analysis of water quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1853-1867, 2010.

JURINKE, C.; OETH, P.; VAN DEN BOOM, D. MALDI-TOF Mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 147-163, 2004.

KAWAI, M.; MATSUTERA, E.; KANDA, H. et al. 16S Ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 2, p. 699–704, 2002.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, v. 9, p. 21-28, 2006.

LEE, A.; McVEY, J.; FAUSTINO, P. et al. Use of *Hydrogenophaga pseudoflava* penetration to quantitatively assess the impact of filtration parameters for 0.2-micrometer-pore-size filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 695-700, 2010.

LUIS NASSIF ONLINE. **A Produção de Amoxicilina na Farmanguinhos**: Farmanguinhos fabrica amoxicilina para a GlaxoSmithKline. Agência Fiocruz de Notícias, 2013. Disponível em: <<http://www.advivo.com.br/blog/luisnassif/a-producao-de-amoxicilina-na-farmanguinhos>>. Acesso em: 28 fev. 2013.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 2000.

MAZZOLA, P.G.; MARTINS, A.M.S.; PENNA, T.C.V. Chemical resistance of Gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. **BMC Infectious Disease**, v. 6, p. 131, 2006.

MEDEIROS, L.M.M., FRAZÃO, A.M.; MATTOSO, J.M.V. et al. **A Bacterioteca de Bio-Manguinhos: estudo da biodiversidade em áreas limpas e sua aplicação na Qualidade**. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumo: 1669-1, 2011. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R1669-1.html>>. Acesso em: 01 mar. 2013.

MERCK. **Merck Microbiology Manual 2000**. Merck KGaA: Darmstadt, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Far-Manguinhos – Remédio para o Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Far-Manguinhos, 2002.

MINOGUE, E.; REDDINGTON, K.; DORAI-RAJ, S. et al. Diagnostics method for the rapid quantitative detection and identification of low-level contamination of high-purity water with pathogenic bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 1005–1013, 2013.

MOURA, F.M. **Desenvolvimento de Método Molecular para Quantificação de Bactérias em Produtos Industrializados**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Núcleo Integrado Em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2010.

OLIVEIRA, F.C.; PELEGRINI, D.D. Controle de qualidade do sistema de produção de água purificada obtida por osmose reversa em indústria farmacêutica. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 36-42, 2011.



PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. Artigo técnico. **SBCC**, p. 36-38, 2009. Disponível em: <[http://www.sbcc.com.br/es/revistas\\_pdfs/ed%2039/39-Biofilmes.pdf](http://www.sbcc.com.br/es/revistas_pdfs/ed%2039/39-Biofilmes.pdf)>. Acesso em: 07 mar. 2013.

PENNA, V.T.C.; MARTINS, S.A.M.; MAZZOLA, P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. **BMC Public Health**, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/2/13>>. Acesso em: 03 mar. 2014.

PERES, B. **Bactérias Indicadoras e Patogênicas em Sistemas de Tratamento de Água, Sistemas Contaminados e Esgoto**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.

SANCHEZ, B. et al. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. **Microbiology**, v. 155, p. 1708–1716, 2009.

SAN, N.O.; NAZIR, H.; DONMEZ, G. Microbiologically influenced corrosion of NiZn alloy coatings by *Delftia acidovorans* bacterium. **Corrosion Science**, v. 64, p. 198-203, 2012.

SELWAL, K.K., SELWAL, M.K.; GANDHI, D.N. Effect of freeze drying process on some properties of *Streptococcus thermophilus* isolated from dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1500-1505, 2011.

SILVA, E.P.; MARTINIS, E.C.P. Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 957–968, 2013.

SILVA, V.N. **Biocidas Alternativos em Sistemas de Resfriamento Industrial**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SINGH, R.; STINE, O.C.; SMITH, D.L. et al. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3412–3420, 2003.

SHERAR, B.W.A.; POWER, I.M.; KEECH, P.G. et al. Characterizing the effect of carbon steel exposure in sulfide containing solutions to microbially induced corrosion. **Corrosion Science**, v. 53, n. 3, p. 955-960, 2011.

SHIH, H.Y.; LIN, Y.E. Efficacy of copper-silver ionization in controlling biofilm and plankton-associated waterborne pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 2032–2035, 2010.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C. et al. Manutenção de Micro-organismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 8, n. 14; p. 1398-1418, 2012.

SULLIVAN, J.; WEIRMAN, C.; KENNEDY, J. et al. Influence of steel gauge on the microstructure and corrosion performance of zinc alloy coated steels. **Corrosion Science**, v. 52, p. 1853–1862, 2010.

THEEL, E.S.; SCHMITT, B.H.; HALL, L. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *corynebacterium* species by bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 3093–3095, 2012.

UBALDE, M.C; BRAÑA, V.; SUEIRO, F. et al. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. **Current Microbiology**, v. 64, p. 597–603, 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 36. ed. – National Formulary. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013. Disponível em: <<http://www.uspnf.com/uspnf/login>>. Acesso em: 30 dez. 2013.

VASAVADA, P.C.; CHANDLER, R.E.; HULL, R.R. Evolving methodologies formicrobiological examination of milk and dairy foods. **Dairy Food And Environmental Sanitation**, v. 13. n. 9, p. 510-515, 1993.

VERROKEN, A.; JANSSENS, M.; BERHIN, C. et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4015–4021, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main Principles. Annex 3. **WHO Technical Report Series**, n. 961, p. 94-147, 2011. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js18679en/>>. Acesso em: 28 fev.2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Good Manufacturing Practices: Water for Pharmaceutical Use. Annex 2. **WHO Technical Report Series**, n. 970, p. 67-89, 2012. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js19832en/>>. Acesso em: 28 fev. 2013.

**ANEXO 1** – Composição dos meios de cultura utilizados para 1 L de preparo.

## 1) Ágar cetrimide

- 20 g de hidrolisado pancreático de gelatina;
- 1,4 g de cloreto de magnésio;
- 10 g de sulfato dipotássico;
- 0,3g de cetrimida;
- 13,6 g de ágar;
- 10 mL de glicerol e
- água purificada.

## 2) Ágar ENDO

- 3,7 g de caseína enzimática hidrolisada;
- 3,7 g de digestão peptídica de tecido animal;
- 7,5 g de triptose;
- 1,2 g de extrato de levedura;
- 9,4 g de lactose;
- 3,3 g de fosfato dipotássico;
- 1 g de fosfato monopotássico;
- 3,7 g de cloreto de sódio;
- 0,1 g de deoxicolato de sódio;
- 0,05 g de lauril sulfato de sódio;
- 1,6 g de sulfito de sódio;
- 0,8 g de fucsina básica;
- 15 g de ágar e
- água purificada.

## 3) Ágar R2A

- 0,5 g de peptona;
- 0,5 de extrato de levedura;
- 0,5 g de caseína ácida hidrolisada;
- 0,5 g de dextrose;

- 0,5 g de amido;
- 0,3 g de piruvato de sódio;
- 0,3 g de hidrogenofosfato de potássio;
- 0,05 g de sulfato de magnésio;
- 15 g de ágar e
- água purificada.

4) Ágar TSA

- 15 g de peptona de caseína pancreática;
- 5 g de farinha de soja obtida por digestão papaínica;
- 5 g de cloreto de sódio;
- 15 g de ágar e
- água purificada.

5) Ágar VRB

- 3 g de extrato de levedura;
- 7 g de peptona de gelatina pancreática;
- 1,5 g de sais biliares;
- 5 g de cloreto de sódio;
- 10 g de glicose monohidratada;
- 15 g de ágar;
- 30 mg de vermelho neutro;
- 2 mg de cristal violeta e
- água purificada.

6) Caldo LB

- 10 g de caseína enzimática hidrolisada;
- 5 g de extrato de levedura;
- 10 g de cloreto de sódio e
- água purificada.

## 7) Caldo TSB

- 17 g de peptona de caseína pancreática;
- 3 g de farinha de soja obtida por digestão papaínica;
- 2,5 g de dextrose;
- 5 g de cloreto de sódio;
- 2,5 g de fosfato dipotássico e
- água purificada.

8) *Skim milk*

- 100 g de leite desnatado e
- água purificada.

**ANEXO 2** – Culturas em placa das espécies bacterianas isoladas do sistema de água purificada de Farmanguinhos.



**Figura 23:** Colônia de *Bacillus cereus* em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 24:** Colônia de *Acinetobacter* sp em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.

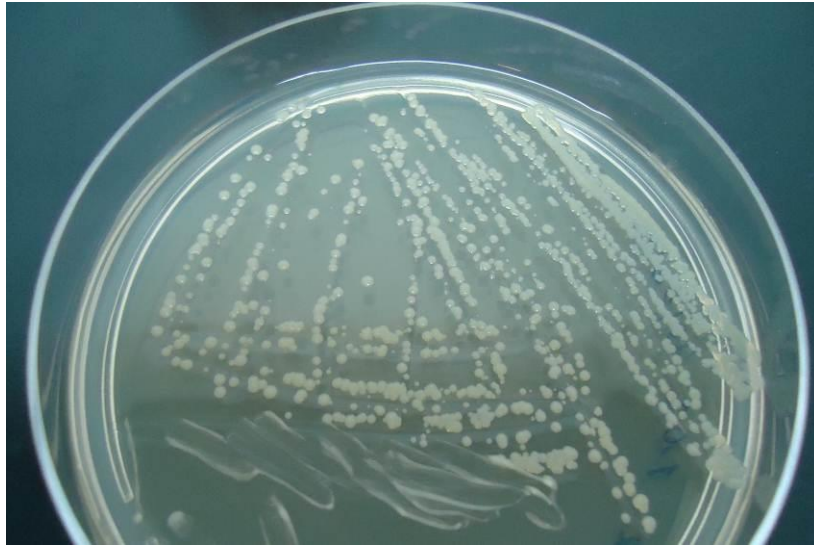


**Figura 25:** Colônia de *Delftia acidovorans* em ágar TSA.  
Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 26:** Colônia de *Staphylococcus warneri* em ágar TSA.  
Fonte: arquivo pessoal.



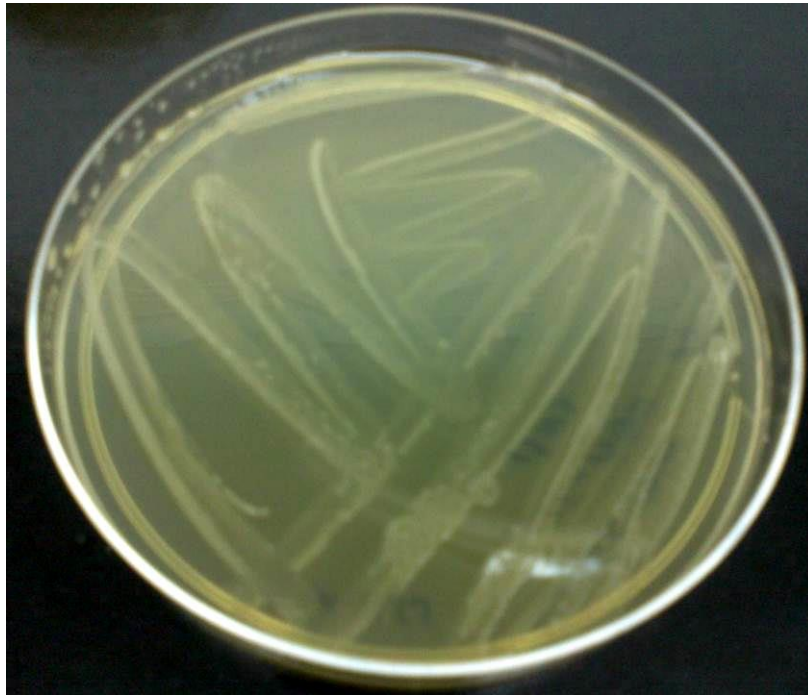


**Figura 27:** Colônia de *Stenotrophomonas maltophilia* em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 28:** Colônia de *Pseudomonas* sp em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.





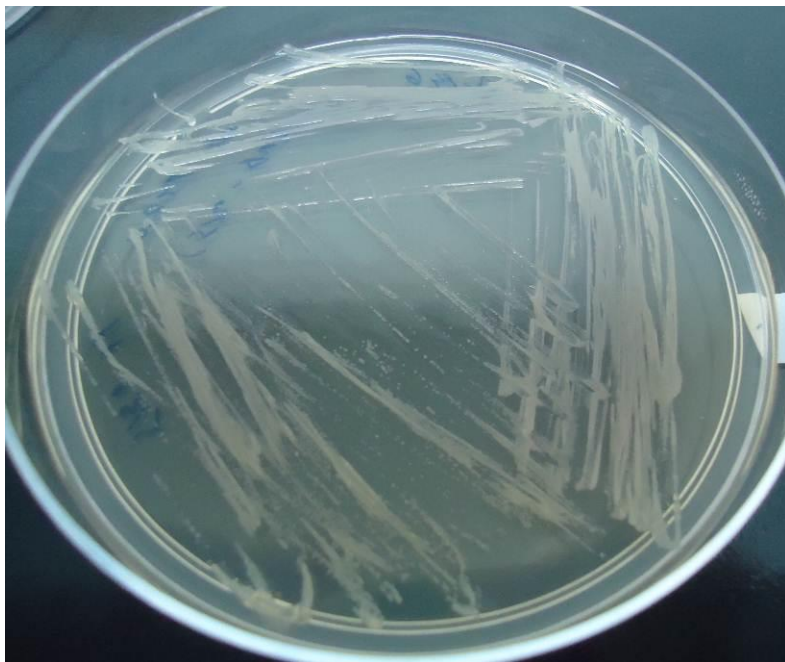
**Figura 29:** Colônia de *Staphylococcus epidermidis* em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 30:** Colônia de *Pseudomonas putida* em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 31:** Colônia de *Pseudomonas oryzae* em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.



**Figura 32:** Colônia de *Burkholderia* sp em ágar TSA. Fonte: arquivo pessoal.