

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

JAQUELINE CARVALHO DE SOUZA

**CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DE  
MEDICAMENTOS ESTÉREIS**

Rio de Janeiro  
2019

Jaqueline Carvalho de Souza

**CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO  
DE MEDICAMENTOS ESTÉREIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica.

Orientador: Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira

Rio de Janeiro  
2019

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

S719c Souza, Jaqueline Carvalho de

Controle de qualidade microbiológico de medicamentos estéreis. /  
Jaqueline Carvalho de Souza. – Rio de Janeiro, 2019.

xiii, 48 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-  
Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais  
Farmacêuticas, 2019.

Bibliografia: f. 45-48

1. Controle de Qualidade. 2. Indústria Farmacêutica. 3.  
Contaminação Microbiana. 4. Produtos Farmacêuticos Estéreis. I. Título.

CDD 615.1

Jaqueline Carvalho de Souza

**CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO  
DE MEDICAMENTOS ESTÉREIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologia Industrial Farmacêutica.

BANCA EXAMINADORA

---

DSc. Joseli Maria da Rocha Nogueira  
ENSP – FIOCRUZ

---

DSc. Fernanda Nunes Santos  
ENSP - FIOCRUZ

---

MSc. Fernanda de Oliveira Bottino  
EPSJV - FIOCRUZ

---

DSc. Tainah Silva Galdino de Paula (suplente)  
ENSP – FIOCRUZ

Rio de Janeiro  
2019

Dedico este trabalho a minha família, por ter me dado  
todo o suporte durante a realização do mesmo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter conseguido chegar até o presente momento.

A minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Joseli Maria da Rocha Nogueira, por ter me dado todo suporte e incentivo para conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Rodrigo Loureiro Cardoso, que me incentivou a não desistir, quando alguns obstáculos surgiram durante a realização da pesquisa.

Aos meus pais Rosaldina Sousa Carvalho e Sérgio de Oliveira Souza, por me apoiarem durante toda a jornada de pós-graduação.

As minhas amigas Gabriela Nascimento Costa e Priscilla Farinhas Cardoso por me apoiarem durante a realização do curso.

A única felicidade da vida está na  
consciência de ter realizado algo de útil  
em benefício da comunidade.

(VITAL BRAZIL)

## RESUMO

O controle de qualidade dos produtos farmacêuticos não é limitado ao aspecto comercial. É um atributo de caráter legal, ético e moral, que deve ser obrigatoriamente atendido, pois diz respeito à saúde das pessoas. O controle de qualidade na indústria farmacêutica refere-se a um conjunto de operações que tem como objetivo verificar e assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos pelo órgão competente, incluindo o controle microbiológico. No Brasil, as indústrias devem cumprir as exigências impostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em conjunto com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010. Este trabalho foi desenvolvido por meio de uma revisão bibliográfica e, teve por objetivo, realizar um levantamento de literatura sobre o controle de qualidade microbiológico de medicamentos estéreis. Ao final, foi possível concluir que o controle de qualidade microbiológico é uma parte essencial da rotina da produção de medicamentos estéreis na indústria farmacêutica. Não apenas pela conformidade com os padrões, mas principalmente pela redução do risco para o usuário final.

Palavras-chave: Controle de qualidade; Indústria farmacêutica; Contaminação microbiana; Produtos farmacêuticos estéreis.

## **ABSTRACT**

The quality control of pharmaceutical products is not limited to the commercial aspect. It is an attribute of legal, ethical and moral character, which must be taken care of as it concerns the health of the people. Quality control in the pharmaceutical industry refers to a set of operations that aims to verify and ensure that the products are within the quality standards required by the competent body, including microbiological control. In Brazil, the industries must comply with the requirements imposed by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) in conjunction with the Resolution of the Collegiate Board of Directors (RDC) nº 17, of April 16, 2010. This work was developed through a bibliographical review, and aimed to carry out a bibliographic survey on the microbiological quality control of sterile drugs. In conclusion, it was possible to affirm that microbiological quality control is an essential part of the routine production of sterile drugs in the pharmaceutical industry. Not only by compliance with standards, but mainly by reducing the risk to the end user.

**Keywords:** Quality control; Pharmaceutical industry; Microbial contamination; Sterile pharmaceutical products.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Filtro HEPA.....	21
<b>Figura 2</b> - Equipamento com sistema fechado para teste de esterilidade. ....	28
<b>Figura 3</b> - Bolsas com meio de cultura de sistema fechado para teste de esterilidade. ....	28
<b>Figura 4</b> - Kit de coagulação em gel para teste de endotoxina bacteriana. ....	30
<b>Figura 5</b> - Equipamento utilizado para realizar testes pelo método fotométrico. ....	31
<b>Figura 6</b> - API 20 E. Kits com 20 testes bioquímicos. ....	32
<b>Figura 7</b> - VITEK 2.....	33
<b>Figura 8</b> - Cartões de identificação para o VITEK. ....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.....	20
<b>Tabela 2</b> - Comparação entre os diferentes sistemas de classificação de limpeza de ar.....	20
<b>Tabela 3</b> - Turbidez para preparação dos inóculos.....	33
<b>Tabela 4</b> - Frequências de monitoramento de rotina de micro-organismos (em operação).....	35
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros microbiológicos para água para injetáveis .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Índice de perfil analítico
BPF	Boas Práticas de Fabricação
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Arrestance</i>
HVAC	<i>Heating, ventilation and air-conditioning</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LAL	Lisado do amebócito do Limulus
NBR	Norma Brasileira
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTC	<i>Over the Counte</i>
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
POP	Procedimento Operacional Padrão
QD	Qualificação de Desempenho
QI	Qualificação de Instalação
QO	Qualificação de Operação
QP	Qualificação de Projeto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UI            Unidade Internacional

USP            *United States Pharmacopeia*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1	Contaminação microbiana e suas fontes .....	17
2.2	Área de produção – Sala Limpa.....	18
2.2.1	Classificação das áreas - Sala Limpa.....	19
2.2.2	Qualidade do ar - Sala Limpa.....	20
2.2.3	Comportamento dos operadores em área limpa.....	21
2.3	Matéria-prima .....	22
2.3.1	Água .....	22
2.3.1.1	Água potável.....	23
2.3.1.2	Água purificada.....	24
2.3.1.3	Água ultrapurificada.....	24
2.3.1.4	Água para injetáveis.....	25
2.3.2	Validação microbiológica do sistema de água.....	25
2.3.3	Monitoramento microbiológico da qualidade da água .....	26
2.4	Teste de esterilidade do medicamento .....	27
2.5	Teste de endotoxina bacteriana – pirogênio .....	29
2.6	Identificação de micro-organismos na indústria.....	31
2.7	Monitoramento ambiental .....	34
2.8	Media fill.....	36
3	JUSTIFICATIVA .....	37
4	OBJETIVOS .....	38
4.1	Geral.....	38
4.2	Específicos .....	38
5	METODOLOGIA.....	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÃO .....	42
	REFERÊNCIAS.....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O setor industrial farmacêutico vem crescendo muito na última década, e junto com ele tem ocorrido um grande aumento da produção e consumo de diversos medicamentos. Diretamente associado a isso, houve a partir de 1960, um aumento do número de casos de infecções associadas ao uso de medicamentos não estéreis. Isto ocorre devido aos produtos farmacêuticos estarem sujeitos à contaminação por micro-organismos durante o processo de fabricação. A contaminação pode originar-se de vários fatores, entre eles: as matérias-primas utilizadas, a forma de estocagem do produto final e a manipulação do mesmo. (CHARNOCK, 2004).

O controle de qualidade dos produtos farmacêuticos não se limita somente ao aspecto comercial, quando visam, sobretudo, a competitividade no mercado. É, além disso, um atributo de caráter legal, ético e moral, que deve ser obrigatoriamente atendido, pois diz respeito à saúde das pessoas. O não cumprimento de especificações de qualidade consideradas indispensáveis para um determinado produto pode resultar em sérias consequências (SERRANO *et al.*, 2005).

O conceito de controle de qualidade em uma indústria farmacêutica refere-se a um conjunto de operações que tem como objetivo verificar e assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos pelo órgão competente. Atualmente no Brasil, as indústrias devem cumprir as exigências impostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em conjunto com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 16 de abril de 2010 (BRASIL, 2010a).

O controle de qualidade tem a responsabilidade de fiscalizar e organizar as seguintes etapas: amostragem de matéria prima e do produto final, especificações, documentação e todos os procedimentos de liberação que garantam que os testes realizados sejam executados e que os materiais utilizados na fabricação do produto, bem como , os produtos finais, não sejam aprovados até que a sua qualidade obtenha resultado satisfatório (BRASIL, 2010a).

Além do controle de qualidade, o setor farmacêutico possui o setor de Garantia da Qualidade. Este setor determina todas as providências adotadas com o objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2010a).

Em 1969, foi divulgado oficialmente o *Good Manufacturing Practices* (GMP) pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Desde 1978, as GMP passaram a ter

aparato legal nos Estados Unidos da América (EUA), forçando as empresas a cumprirem tais orientações, sob pena de serem sancionadas, ao descumprirem as recomendações. Relacionado a estudos, recomendações e normas para a garantia da qualidade e eficácia dos produtos farmacêuticos, também se destacam os guias referentes às Boas Práticas de Fabricação (BPF), que possuem os mesmos parâmetros da GMP. As BPF é uma atualização das GMP criadas anteriormente, portanto são as referências usadas atualmente pelas indústrias farmacêuticas (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

No setor de Garantia da Qualidade, utiliza-se as BPF para assegurar que os produtos serão consistentemente produzidos e controlados, seguindo os padrões de qualidade adequados para o uso pretendido e requerido pelo registro. A execução das BPF está relacionada à diminuição dos riscos particulares a qualquer produção farmacêutica, que não podem ser localizados somente pela realização de testes nos produtos finais. Os riscos constituem-se basicamente em contaminação cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura de produtos (BRASIL, 2010a).

De acordo com a vigilância sanitária, os produtos a ela submetidos, respeitando suas individualidades, devem ser fabricados, armazenados, transportados e dispensados de forma a apresentarem a segurança necessária para o seu uso ou consumo, considerando neste caso os medicamentos, biológicos, fitoterápicos, correlatos, cosméticos, saneantes e insumos, os quais devem respeitar limites microbianos (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

A qualidade microbiológica dos produtos farmacêuticos é definida por padrões microbianos descritos em compêndios oficiais, farmacopeias e normas regulamentadoras. Quando nos referimos a produtos estéreis, estes devem estar ausentes de micro-organismos para que possam ser aprovados para comercialização (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

O local onde o produto é fabricado, chamado de sala limpa é um requisito essencial na produção asséptica do medicamento. Realizar testes para comprovar a manutenção das condições físicas e microbiológicas do ambiente produtivo é um ponto crucial do controle de qualidade do processo (HERTROYS et al., 1997). Para que isso ocorra, alguns fatores do ambiente de produção devem ser monitorados, tais como: qualidade do ar, água, gases, vestimentas, superfícies, etc. Além disso, deve-se levar em consideração o impacto humano no processo asséptico, pois é

imprescindível ao operador estar em boas condições de saúde e realizar treinamentos específicos constantes (AKERS, 1997).

Nas décadas de 60 e 70, os colaboradores que trabalhavam paramentados, realizavam tarefas em diversas áreas produtivas, não havendo muita separação entre áreas classificadas, aumentando assim a probabilidade de contaminação do produto. Com o avanço da evolução tecnológica, ocorreu a modernização da manipulação asséptica e a automação das operações. Nas décadas de 80 e 90 foram criados equipamentos de enchimento mais rápidos e mais eficientes, de modo que o operador teria um contato mais restrito ao processo produtivo, diminuindo assim, a probabilidade de contaminação microbiana (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os produtos estéreis são formas farmacêuticas isentas de micro-organismos. Estes incluem os produtos parenterais, oftálmicos e os que se destinam a irrigações. Entre eles, os produtos parenterais devem ter destaque, já que são injetados diretamente na corrente sanguínea e, portanto, devem estar obrigatoriamente isentos de contaminação microbiana e de substâncias tóxicas (AVIS, 1999).

A fabricação de um medicamento estéril ou não, requer um conjunto de análises durante as etapas do processo. Essas análises são realizadas pelos setores microbiológico e físico-químico do controle de qualidade. Nos itens a seguir, serão abordados os aspectos referentes ao setor microbiológico (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

### 2.1 Contaminação microbiana e suas fontes

Os micro-organismos de importância para indústria farmacêutica são classificados em três grupos: bactérias, fungos e vírus. Bactérias e fungos tem estrutura celular para se replicar, já os vírus são menores e mais simples e dependem das células eucarióticas e procarióticas para replicação (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

Para investigar os micro-organismos encontrados nos produtos farmacêuticos, é fundamental que se conheçam as fontes e os mecanismos responsáveis por esta contaminação. Se houver contaminantes microbianos nas matérias-primas que serão utilizadas na fabricação, esses serão transferidos para o produto. Além disso existe a possibilidade de haverem contaminantes oriundos de equipamentos, do ambiente de produção, dos materiais de embalagem e dos operadores envolvidos (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

A multiplicação de micro-organismos, principalmente bactérias Gram-negativas, pode ocorrer de forma rápida nos espaços inertes, como juntas e válvulas, onde água e resíduos do produto se acumulam, ocasionando contaminação resistente e de difícil eliminação (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990).

Os micro-organismos ambientais encontrados em paredes secas, compreendem principalmente bastonetes Gram-positivos, cocos e fungos (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990).

Em áreas úmidas, como pias e drenos, ocorre particularmente, proliferação de *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter sp.* A contaminação aérea é principalmente associada à poeira e escamas da pele, que podem veicular esporos bacterianos e cocos (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

Para realização de todos os testes microbiológicos que necessitam de meios de cultura para sua realização, estes devem passar também por um controle de qualidade, a fim de assegurar sua fertilidade e sua qualidade para que seja possível haver crescimento microbiano. Além disso, o controle de qualidade microbiológico deve verificar as condições de armazenamento dos meios de cultura, bem como certificar-se de que o seu método de preparo está correto e as suas propriedades de funcionamento estão dentro das especificações estabelecidas (SUTTON, 2012).

## **2.2 Área de produção – Sala Limpa**

A planta da área destinada ao processamento de envase asséptico constitui-se na instalação mais complexa, a fim de garantir total conformidade com os requisitos regulatórios. Ela deve possuir sistemas integrados que, atendam de forma confiável as exigências inerentes a fabricação, ao controle de qualidade e outras funções necessárias. Uma planta bem planejada tem a capacidade de flexibilizar mudanças decorrentes de alterações nos requisitos regulatórios e tecnológicos, além de proporcionar adequado fluxo de materiais, pessoal e equipamentos (ASLUND; OLSOM; SANDELL, 1977).

As áreas de envase asséptico são áreas limpas utilizadas na fabricação de produtos estéreis, portanto, devem ser salas pressurizadas e o acesso de pessoas e materiais circulando deve ser restrito. (BRASIL, 2010b).

Os vestiários das áreas classificadas como salas limpas, devem possuir espaço adequado para abrigar as roupas estéreis e para que o colaborador possa efetuar a vestimenta. É obrigatório que haja treinamento dos colaboradores quanto a vestimenta. Esse treinamento deve abranger o uso correto das roupas estéreis como, macacões, luvas e outros itens que propiciem a cobertura da superfície do corpo (BRASIL, 2010b).

As áreas devem ser sanitizadas e todo o processo de sanitização deve ser documentado. Para se obter a certificação e a validação do processo e áreas assépticas são realizados testes microbiológicos, a fim de comprovar a eficiência de

alguns pontos, tais como: os sistemas de filtração, o monitoramento microbiológico do ambiente e a simulação de enchimento asséptico do produto, empregando meio de cultura estéril, conhecido como Media fill (BRASIL, 2010b).

Cada operação de fabricação requer um nível de limpeza adequado para cada ambiente, de modo a minimizar os riscos de contaminação do produto ou dos materiais manuseados. O grau de exigência vem diminuindo conforme a classificação das áreas (BRASIL, 2010a).

### **2.2.1 Classificação das áreas – Sala Limpa**

As áreas são classificadas segundo as características ambientais requeridas, conforme a ABNT NBR ISO 14644-1, que estabelece a concentração máxima permitida de partículas em suspensão para cada classe: Classe A, zona de operações de alto risco, geralmente proporcionado por um posto de trabalho com fluxo laminar de ar; Classe B, condições assépticas de preparação e enchimento (retorno para zona de nível A); e Classe C e D, áreas limpas para executar etapas menos críticas da produção de medicamentos estéreis (EUDRALEX, 2008).

Para contar as partículas não viáveis na área, é utilizado um equipamento medidor, no qual é programado para somatizar de acordo com o tamanho da partícula, conforme descrito na Tabela 1 (entre 0,1 $\mu$ m a 5  $\mu$ m de tamanho de partícula), baseado na norma da ABNT NBR ISO 14644-1. Após a medição, é verificado o n° de partículas encontradas e assim é definida a classificação da área (BRASIL, 2013).

Na Tabela 2 mostra um comparativo de diferentes nomenclaturas de classificação utilizadas em países distintos, com normas e guias distintos (BRASIL, 2013).

**Tabela 1** - Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.

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

Fonte: BRASIL, 2010b.

**Tabela 2** – Comparação entre os diferentes sistemas de classificação de limpeza de ar.

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

Fonte: BRASIL, 2010b.

Nas áreas de classe B, com câmara de fluxo laminar de classe A as superfícies expostas devem ser lisas, contínuas e sem falhas, a fim de minimizar os riscos de acumulação e proliferação de partículas, permitindo a repetida aplicação e utilização de agentes de limpeza e desinfetantes adequados. Para reduzir o ac de poeiras e facilitar a limpeza não podem existir zonas inacessíveis e deve ser minimizada a existência de barreiras físicas (PIC/S, 2007).

### 2.2.2 Qualidade do ar – Sala Limpa

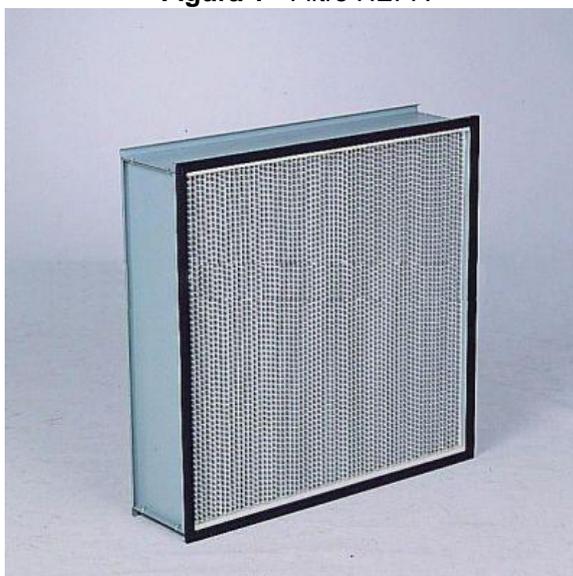
Um dos mais importantes fatores, que definem uma sala limpa e protegem a zona crítica é a qualidade do ar. Esta é definida de duas formas: através da concentração de partículas de dimensões definidas e pelos níveis de contaminação microbiana (ABNT, 2005).

O principal método de redução do número de partículas viáveis e não viáveis no ar é conhecido como Sistema de Aquecimento, Ventilação e Condicionamento de Ar (HVAC – *Heating, ventilation and air-conditioning*). O sistema compreende um pré

filtro, para evitar que o filtro se torne rapidamente sobrecarregado e um filtro absoluto de alta eficiência, conhecido como filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Arrestance*). O filtro HEPA é extremamente eficiente na remoção de partículas em um fluxo de ar. (CADWELL, 1983).

Filtros HEPA (Figura 1) são fabricados conforme padrões internacionais, que definem a eficiência do filtro em termos de sua capacidade de reter partículas de determinados tamanhos (CADWELL, 1983).

**Figura 1 - Filtro HEPA**



Fonte: DIRECT INDUSTRY, 2019.

### **2.2.3 Comportamento dos operadores em área limpa**

Pessoas são importantes transportadores de micro-organismos, devido a dispersarem partículas através da pele e de suas vestimentas, portanto, para operarem em uma área limpa, é necessário vestirem roupas que minimizem essa dispersão. As roupas específicas para sala limpa são fabricadas com um tecido que dispersa poucas partículas (WHYTE, 2013).

Todos os colaboradores que atuam em uma área limpa, devem passar por diversos treinamentos para aprenderem a forma de se comportar na mesma, bem como a maneira de vestir a roupa específica. Esses treinamentos devem ocorrer frequentemente, como forma de atualização dos operadores (WHYTE, 2013).

## **2.3 Matéria-prima**

Matéria-prima farmacêutica é definida como qualquer substância ativa ou excipiente utilizados no processo de fabricação de uma forma farmacêutica. Esta substância pode permanecer inalterada ou sofrer qualquer modificação durante o processo. De acordo com a função do produto, as matérias-primas são classificadas em dois grupos: os ingredientes ativos com atividade farmacológica, e os excipientes que permitem sua adequação à via de administração (LA ROSA; MADINA; VIVAR, 1985).

O uso de matérias-primas de boa qualidade é um dos requisitos necessários para que as Boas Práticas de Fabricação na indústria farmacêutica sejam cumpridas. O controle de contaminação microbiológica das matérias-primas é extremamente importante, pois os micro-organismos podem contaminar o produto acabado e as instalações da indústria, causando uma contaminação contínua do produto, o que, geralmente, torna-se um processo difícil de ser controlado e eliminado. Entre os produtos mais frequentes de contaminação dos medicamentos estão os excipientes (LA ROSA; MADINA; VIVAR, 1985).

Uma matéria-prima que merece especial atenção devido ao amplo uso em formulações farmacêuticas e cosméticas é a água, a qual também é utilizada em diferentes tipos de limpeza e operações unitárias nas farmácias (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

### **2.3.1 Água**

A água é a matéria-prima mais utilizada na produção farmacêutica, de biotecnologia, correlatos e cosméticos. Pode ser utilizada direta ou indiretamente, podendo ter grande impacto na qualidade do produto (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

Existem diferentes tipos de água dentro de uma indústria farmacêutica. Dentre elas, podemos destacar: água potável, água purificada, água ultrapurificada e água para injetáveis (BRASIL, 2010b).

Algumas farmacopeias internacionais especificam, além dessas, outros tipos de água, como: acondicionadas em frascos, estéreis ou bacteriostáticas, para irrigação ou inalação (BRASIL, 2010b).

Os diferentes tipos de pureza da água apresentam suas próprias características microbiológicas, que são relacionadas ao método e grau de purificação, assim como a estocagem e distribuição (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

#### 2.3.1.1 Água potável

Esta água é mencionada pela *United States Pharmacopeia* (USP) como adequada para muitas aplicações, incluindo as etapas iniciais de limpeza de equipamentos, como água de origem para purificação subsequente, e como mínima qualidade de água permitida para fabricação de fármacos, quando compatível com o processo. Neste caso não se aplica para fabricação de medicamentos estéreis (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

A água é retirada de mananciais e passa por tratamento para se tornar potável. São realizados os procedimentos ideais para atender às especificações da legislação brasileira com relação aos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e radioativos, para um determinado padrão de potabilidade (BRASIL, 2010b).

Os ensaios microbiológicos são realizados por método pour plate, no qual é retirado uma alíquota de 1mL de água, inoculado em uma placa de petri estéril, em seguida é adicionado meio de cultura. A placa é incubada em estufa até ser retirada para realizar a leitura (BRASIL, 2010b).

Atualmente existe uma Portaria nº 2.914/MS de 2011, na qual recomenda-se que para bactérias heterotróficas o limite máximo permitido de microrganismos não ultrapasse 500 UFC/mL em água potável para consumo humano (BRASIL, 2011).

Os coliformes são rigidamente controlados na água potável de abastecimento urbano não sendo exigida sua absoluta ausência, com exceção para a *Escherichia coli*, que deve ter absoluta ausência (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

Para detectar coliformes totais e fecais podem ser utilizados reagentes rápidos, comercializados por distintos fabricantes, no qual alteram a coloração da amostra de água analisada em caso de presença dos mesmos (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

O absoluto controle e a manutenção de conformidade dos parâmetros de potabilidade da água são fundamentais, críticos e de responsabilidade do usuário do sistema de purificação que será alimentado (BRASIL, 2010b).

### 2.3.1.2 *Água purificada*

Através da água potável será produzida a água purificada, através de sistemas de purificação, como: troca iônica; osmose reversa; eletrodeionização; ultra filtração ou múltipla destilação. Esse tipo de água deve atender às especificações estabelecidas na farmacopeia vigente para o país de origem. Não é adicionada nenhuma substância para esse tipo de água. (BRASIL, 2010b).

É utilizada como excipiente na produção de medicamentos não parenterais e em formulações magistrais, porém não pode ser utilizada em formulações que exigem um grau maior de pureza e que exigem ser apirógenas. De acordo com a utilização, pode ser esterilizada, não havendo necessidade de atingir os mesmos parâmetros de limite de endotoxina estabelecidos para a água para injetáveis (BRASIL, 2010b).

Preconiza-se realizar testes microbiológicos, afim de contar o total de micro-organismos aeróbicos viáveis, na água utilizada para produção e água de estocagem. Esse monitoramento deve ser realizado, visto que na água purificada não é adicionado inibidor de crescimento. O teste microbiológico é realizado através do método de filtração por membrana. Após a filtragem da água, a membrana filtrante é retirada do compartimento de filtração e inoculada em uma placa de petri contendo meio de cultura, logo essa placa é incubada em uma estufa até o momento da leitura (BRASIL, 2010b).

O teste de endotoxina bacteriana é realizado por um dos métodos preconizados pela farmacopeia brasileira: coagulação em gel, turbidimétrico ou cromogênico (BRASIL, 2010b).

O limite permitido para contagem total de bactérias heterotróficas, mesófilas e aeróbicas, deve ser  $< 100$  UFC/mL e para presença de endotoxinas deve ser  $< 0,25$  UI de endotoxina/mL (BRASIL, 2010b).

Embora seja especificada na farmacopeia brasileira, uma contagem microbiana de no máximo 100 UFC/mL para água purificada, as indústrias devem estabelecer o seu próprio limite de alerta ou de ação, em casos mais específicos, onde requerer maior restrição do nº de micro-organismos presentes, assim definindo seus limites apropriados (BRASIL, 2010b).

### 2.3.1.3 *Água ultrapurificada*

Esse tipo de água é utilizada em situações mais específicas, principalmente em laboratórios de testes, em diluição de substâncias de referência, no controle de qualidade e na limpeza final de equipamentos utilizados em alguma etapa da produção que necessite da água com esse nível de pureza. A empregabilidade ideal se dá para métodos de análise que exigem mínima interferência e máxima precisão e exatidão (BRASIL, 2010b).

O teste microbiológico para esse tipo de água é semelhante ao de água purificada, porém o limite permitido para endotoxina deve ser  $< 0,03$  UI de endotoxina/mL e para contagem total de bactérias deve ser  $< 1$  UFC/100 mL (BRASIL, 2010b).

#### 2.3.1.4 *Água para injetáveis*

A água para injetáveis tem sua empregabilidade como excipiente na produção de produtos farmacêuticos parenterais e estéreis, na fabricação de princípios ativos de uso parenteral, outros produtos que exijam o controle de endotoxinas e não são submetidos a processos que as eliminem e na limpeza equipamentos que tenham contato direto com as formas parenterais na produção de medicamentos. O controle microbiológico é mais rigoroso quando se refere a esse tipo de água, não permitindo a ocorrência de contaminação microbiana, nem de endotoxinas, quando se refere a medicamentos estéreis. A água para injetáveis deve atender aos ensaios físico químicos igualmente preconizados para a água purificada, além dos testes microbiológicos de contagem total de bactérias heterotróficas, mesófilas e aeróbias (BRASIL, 2010b).

O teste microbiológico para esse tipo de água é semelhante ao de água purificada e ultrapurificada, e seus limites permitidos pela farmacopeia brasileira devem ser  $< 10$  UFC/ 100 mL para contagem de micro-organismos e para endotoxinas bacterianas o valor máximo permitido é de 0,25 UI de endotoxina/mL (BRASIL, 2010b).

### 2.3.2 **Validação microbiológica do sistema de água**

A finalidade de validar um sistema de água é garantir a confiabilidade do mesmo, desde o momento em que a água ainda não está preparada para

fabricação, durante seu armazenamento e distribuição até o momento de utilização. A validação inclui as seguintes etapas: qualificação do projeto (QP); qualificação de instalação (QI); qualificação de operação (QO) e qualificação de desempenho (QD) (BRASIL, 2010b).

### **2.3.3 Monitoramento microbiológico da qualidade da água**

O monitoramento da água para finalidade farmacêutica é realizado pelo controle microbiológico e físico químico.

De acordo com a farmacopeia brasileira, não se faz necessário identificar os micro-organismos encontrados durante as análises microbiológicas, porém deve ser realizada a contagem total de bactérias (BRASIL, 2010b).

Embora não seja obrigatório a realização da identificação de microrganismos, a mesma auxilia nas medidas preventivas para minimizar as contaminações ocorrentes no sistema de água (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

As amostras de água que contenham agentes sanitizantes devem ser neutralizadas antes de iniciar um teste microbiológico, pois o sanitizante pode influenciar no resultado, provocando uma resposta falso negativa em uma amostra que possa vir a estar contaminada (BRASIL, 2010b).

Os testes microbiológicos devem ser realizados por um período de até duas horas após a coleta da amostra de água, caso contrário essa amostra deverá ser exposta a refrigeração na faixa entre 2°C a 8°C por até 12 horas. Em caso extremo, em que o teste não possa ser realizado em até 12 horas, manter a amostra de água em refrigeração por no máximo 24 horas e assim executar o teste, afim de manter as características microbiológicas durante a realização da análise (BRASIL, 2017).

O fabricante do medicamento deve estipular através de análise de risco, limites de alerta e de ação, que auxiliam nas providencias cabíveis diante de contaminação que atinjam esses limites já pré-estabelecidos (BRASIL, 2010b).

O limite de alerta indica um aviso de desvio da qualidade e não é obrigatório realizar ação corretiva. Esse limite pode ser definido através de análise de tendências históricas do referido fabricante. Pode ser utilizado dois desvios-padrão, ou 70% do limite de ação definido, ou a 50% da contagem do número de micro-organismos, o que for menor. O limite de ação indica que o desvio da

qualidade ultrapassou os número tolerável de contaminação e exige interrupção da atividade para que ocorra medidas corretivas (BRASIL, 2010b).

#### **2.4 Teste de esterilidade do medicamento**

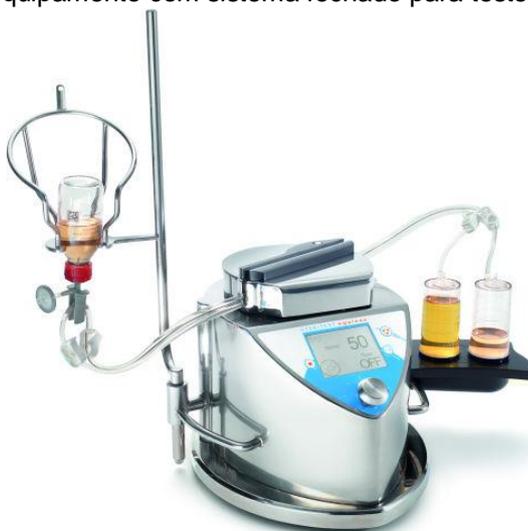
Para realizar o teste de esterilidade em produtos farmacêuticos, as amostras devem ser preparadas de modo a evitar possíveis falsos resultados, portanto, os frascos ou ampolas contendo o medicamento que será analisado, devem ser tratados, a fim de minimizar contaminação cruzada proveniente da parte externa da embalagem. A assepsia pode ser realizada por imersão dos frascos ou ampolas de medicamentos em soluções antissépticas, tal como álcool (BRASIL, 2010b).

Durante o preparo das amostras de medicamentos, deve-se identificar as mesmas, a fim de não haver misturas de lotes para facilitar a liberação de resultados, bem como garantir a confiabilidade dos mesmos. Esse teste deverá ser realizado em áreas limpas e dentro de um fluxo laminar. O teste baseia-se em constatar a total esterilidade do medicamento, uma vez que o mesmo deve ser isento de qualquer contaminação (BRASIL, 2010b).

O teste de esterilidade pode ser realizado utilizando os métodos de filtração em membrana por sistema aberto ou fechado (Figura 2 e 3) ou por inoculação direta, no qual a amostra é diretamente inoculada no meio de cultura. Qualquer meio de cultura utilizado deverá ter sido aprovado no seu teste de promoção de crescimento (BRASIL, 2010b).

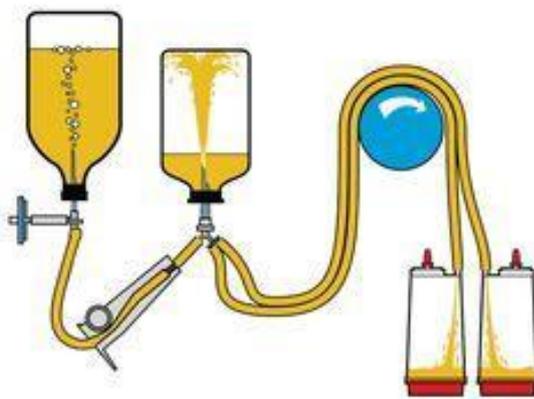
Ambos os métodos são realizados através de uma inoculação da amostra em frascos estéreis, e em seguida é adicionado meios de cultura e os mesmos são incubados em estufas até o momento da leitura. O que difere o sistema aberto do fechado é a forma de inoculação e manipulação do teste. No sistema aberto, o operador utiliza um frasco estéril contendo meio de cultura e inocula a amostra a ser analisada, esse processo é todo realizado manualmente. No sistema fechado, o operador manipula um equipamento no qual irá fazer a inoculação da amostra e do meio de cultura, evitando assim o contato direto e minimizando os riscos de contaminação cruzada (MERCK MILLIPORE, 2018).

**Figura 2** - Equipamento com sistema fechado para teste de esterilidade.



Fonte: MERCK MILLIPORE, 2018.

**Figura 3** - Bolsas com meio de cultura de sistema fechado para teste de esterilidade.



Fonte: MERCK MILLIPORE, 2018.

Os dois meios de cultura utilizados para testes de esterilidade são: o caldo de tioglicolato e o caldo de caseína soja. O primeiro é utilizado para cultura de bactérias anaeróbicas, embora, também detecta o crescimento de bactérias aeróbicas. O segundo é indicado para a cultura de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas (BRASIL, 2010b).

Após realizado os testes, os meios de cultura são incubados por 14 dias em estufas de incubação com a temperatura adequada para cada meio. São realizadas leituras diárias para observar se houve algum tipo de contaminação (MERCK MILLIPORE, 2018).

## 2.5 Teste de endotoxina bacteriana – pirogênio

A palavra pirogênio é relacionada a palavra grega *pyro*, que significa ardente ou fogo, descrição adequada para compostos que produzem aumento da temperatura corporal. As substâncias que induzem febre são chamadas pirogênios (PEARSON, 1985).

Existem duas classes de pirogênios: exógenos e endógenos. Os exógenos são aqueles que têm origem extracorporal e induzem temperaturas elevadas quando injetados em humanos e animais. Os endógenos são produzidos pelo hospedeiro em resposta ao estímulo provocado por diversos pirogênios exógenos (PEARSON, 1985).

Os níveis de pirogênios são fundamentais para a liberação de produtos farmacêuticos. No que diz respeito ao controle de qualidade, medicamentos injetáveis de grande ou pequeno volume, bem como, acessórios para transfusão, infusão e todos os dispositivos implantáveis ou descartáveis empregados em terapia parenteral, necessitam oferecer segurança ao paciente, logo não devem conter pirogênio (PEARSON, 1985).

As endotoxinas são complexos de alto peso molecular agregados a membrana externa de bactérias Gram-negativas, e representam a principal fonte de pirogênio para indústria farmacêutica (MORALES, 2004).

A maior parte dos mamíferos é afetada pelas endotoxinas. Estudos demonstraram que a injeção de bactérias Gram-negativas vivas ou mortas provoca diversas reações patofisiológicas que variam de uma leve alteração de temperatura, alteração na contagem de leucócitos do sangue, coagulação intravascular disseminada, hipotensão, choque e até mesmo óbito. A detecção e a eliminação de endotoxina bacteriana em fármacos são de suma importância para os usuários (FUKUMORI *et al.*, 2008).

A endotoxina resiste ao calor, dessecação, pH extremos e vários tratamentos químicos, por isso a validação do processo de destruição ou remoção da endotoxina na produção de injetáveis é um fator crítico para o fabricante (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

O teste de endotoxina bacteriana é realizado na amostra a qual for preconizado pela farmacopeia, para identificar ou quantificar endotoxinas de bactérias do tipo Gram-negativas. Para executar o teste é utilizado um extrato

aquoso dos amebócitos circulantes de duas espécies de artrópodes conhecidos como: *Limulus polyphemus* ou do *Tachypleus tridentatus*. Através dessa extração é preparado um reagente, conhecido como Lisado do Amebócito do Limulus (LAL) no qual é utilizado para realizar as análises (BRASIL, 2010b).

Existem dois métodos de análise com sensibilidades diferentes para execução desse teste. O método de coagulação em gel e os métodos fotométricos (BRASIL, 2010b).

No método de coagulação em gel, a amostra é inserida em tubos contendo o reagente LAL (F e esses tubos são incubados em banho maria, a temperatura de 37°C por 1 hora. É realizada a leitura, inclinando os tubos a 180° e verificando a formação de um coágulo ou gel no fundo do mesmo. Em caso de positivo, é considerada presença de endotoxina. Esse método é semi-quantitativo, portanto, não é possível medir a quantidade exata de endotoxina presente na amostra (BRASIL, 2010b).

Já os métodos fotométricos podem ser realizados de duas formas: o método turbidimétrico e o método cromogênico. No método turbidimétrico, ocorre o surgimento de uma turbidez após a quebra de um substrato endógeno. Esse método é realizado em equipamento (Figura 5), no qual as amostras são inseridas em placas de teste apirógenas, com reagente LAL e essa placa é colocada no equipamento que irá realizar a leitura. No método cromogênico, ocorre um pigmento corado após quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno. Esse teste também é realizado em equipamento no qual as amostras são expostas a reagentes e o mesmo faz a leitura. Ambos os métodos fotométricos são quantitativos, ou seja, é possível saber a quantidade de endotoxina presente na amostra (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015).

**Figura 4** - Kit de coagulação em gel para teste de endotoxina bacteriana



Fonte: BIOENDO, 2019.

**Figura 5** - Equipamento utilizado para realizar testes pelo método fotométrico.



Fonte: LONZA, 2018.

Além desses métodos, há também os testes realizados em animais, esses testes são conhecidos como testes de pirogênio *in vivo*. Ele é baseado na verificação do aumento da temperatura corporal em coelhos, após injeção intravenosa da solução estéril que está sendo analisada (BRASIL 2010b).

## 2.6 Identificação de micro-organismos na indústria

A identificação de micro-organismos pode ser realizada por diversos métodos, sendo as técnicas de biologia molecular as mais precisas, tais como fingerprint e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Contudo, estes métodos exigem mão de obra especializada, além de serem demorados, dificultando uma resposta rápida à presença de patógenos bacterianos em laboratórios da indústria farmacêutica (PREISNER et al., 2010).

Atualmente, na indústria farmacêutica utilizam-se majoritariamente uma metodologia manual que utiliza a galerias API (Índice de Perfil Analítico) ou um

método automatizado que utiliza o sistema VITEK. Estes métodos são utilizados devido à facilidade e rápida execução da técnica, além de serem facilmente adaptados à rotina de um laboratório de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos (BECKER; SKOV; VON EIFF, 2009).

As galerias API baseiam-se no conceito da identificação numérica. A galeria API 20 E (BioMérieux®) é um método de identificação de micro-organismos que utiliza tiras que contêm até 20 pequenos poços onde as reações bioquímicas ocorrem (Figura 6).

**Figura 4 - API 20 E. Kits com 20 testes bioquímicos.**



Fonte: BIOMÉRIEUX, 2018.

Os poços são incubados com suspensão bacteriana proveniente de uma cultura pura. Após inoculação, mudanças de cor indicam as diferentes reações. A leitura é realizada de acordo com uma tabela. A identificação é realizada através de um sistema informatizado de identificação ou um catálogo analítico, onde se obtém a identificação do perfil numérico com sete algarismos, denominada de índice de perfil analítico (API). O programa interpreta um grande número de perfis que permite a identificação de cerca de 600 espécies de bactérias e leveduras. O teste API baseia-se em testes de assimilação de elementos enzimáticos e compostos de carbono, cujo número varia de acordo com o kit API de ensaio utilizado (JUANG; MORGAN, 2001).

O VITEK (Figura 7) é um sistema de identificação microbiano completamente automatizado que fornece condições de identificação de colônias através de testes bioquímicos. Este método baseia-se em uma tecnologia colorimétrica, onde o sistema lê os cartões que contém 64 orifícios, utilizando 3 comprimentos de onda diferentes. Existem requisitos para a preparação adequada do inóculo: meios de cultura, idade da cultura, condições de incubação e turbidez. A turbidez é ajustada em conformidade (Tabela 3) e medida utilizando um medidor de turbidez chamado *DensiChek* (PINCUS, 2018).

**Figura 5 - VITEK 2.**

Fonte: BIOMÉRIEUX, 2018

**Tabela 3 - Turbidez para preparação dos inóculos.**

<b>Produto</b>	<b>Gama de turbidez McFarland</b>
Gram-negativa	0,50-0,63
Gram-positiva	0,50-0,63
Levedura	1,80-2,20
Bacilos	1,80-2,20

Fonte: PINCUS, 2018.

Os inóculos são preparados em tubos estéreis e acomodados em um compartimento chamado cassete. Após a acomodação dos tubos, são introduzidos os cartões de identificação (Figura 8). Cada cassete comporta até 10 testes. A mesma é inserida manualmente em uma estação de câmara de vácuo.

O vácuo que se forma dentro do equipamento faz com que a suspensão do micro-organismo seja forçada, através do tubo de transferência, a preencher os micro-canais que chegam a todos os poços da carta. Cada um dos poços contém um teste individual a um substrato, podendo ser avaliadas atividades como acidificação, alcalinização, a hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras (PINCUS, 2018).

**Figura 6** - Cartões de identificação para o VITEK.



Fonte: BIOMÉRIEUX, 2018.

## 2.7 Monitoramento ambiental

Na indústria, o monitoramento ambiental é aplicado com a finalidade de obter resultados quantitativos e estes serem analisados para aferir se estes resultados se enquadram com sua respectiva classificação. Cada área classificada tem o seu período de monitoramento, sendo nas áreas de grau A e B, realizados diariamente e em todos os processos produtivos. Em áreas de grau C é realizado uma vez por semana, e nas áreas de grau D, o monitoramento é realizado mensalmente (XAVIER *et al.*, 2013).

De acordo com as BPF, existem algumas análises que devem ser realizadas para o monitoramento de micro-organismos em salas limpas, entre elas: amostragem volumétrica de ar, placas de sedimentação e placas de contato expostas na área monitorada e monitoramento de operadores (BRASIL, 2013).

O monitoramento ambiental deve ser realizado de acordo com o plano de amostragem e a análise de risco, onde é programado todo o processo. Ambos são desenvolvidos pelos setores envolvidos no processo de monitoramento ambiental, tais como, garantia e controle de qualidade. Os locais onde o produto é exposto e os momentos em que há atividades de manipulação do produto pelos operadores, devem ser incluídos no plano de amostragem, além disso, deve-se considerar o pontos próximos aos locais em que o produto é exposto e onde são manipulados materiais ou superfícies que estarão em contato com o produto posteriormente. Se acaso houver alguma impossibilidade de ser realizado o monitoramento ou o mesmo apresentar algum risco para o produto, pode não ser realizada a amostragem, desde

que seja baseada em evidências, na qual devem ser devidamente documentadas e aprovadas pelos responsáveis envolvidos no processo (BRASIL, 2013).

Durante o monitoramento ambiental, deve se atentar para fatores como: alto fluxo de ar na área, alta turbulência, temperatura elevada ou condições de baixa umidade, pois estes podem interferir na integridade e na fertilidade dos meios de cultura das placas de sedimentação que estarão expostas. Devem ser realizadas validações para estabelecer o tempo em que uma placa de sedimentação com meio de cultura pode ser deixada exposta diante os fatores citados e ainda manter a fertilidade ideal para o crescimento dos micro-organismos de interesse (BRASIL, 2013).

De acordo com a Tabela 4, verificamos a frequência na qual deve ser realizado o monitoramento ambiental nas áreas classificadas. Fica a critério de cada fabricante utilizar frequências mais altas ou mais baixas, quando julgar necessário, devido a resultados de monitoramento, com exceção das áreas com classes A e B (BRASIL, 2013).

**Tabela 4** - Frequências de monitoramento de rotina de micro-organismos (em operação)

Classificação	Amostra de Ar cfu/m <sup>3</sup>	Placas (diâmetro de 90 mm) cfu/4 horas	Placas de contacto (diâmetro de 55 mm) cfu/placa	Impressão de luva de 5 dedos cfu/luva
Grau A (operações de envase asséptico)	Uma vez por turno	Por todo o tempo que a atividade de produção for realizada	Uma vez por turno	Uma vez por turno
Grau B	Diariamente	Diariamente	Diariamente	Diariamente
Grau C	Semanalmente	Semanalmente	Semanalmente	N/A
Grau D	Mensalmente	Mensalmente	N/A	N/A
Estações de fluxo de ar unidirecional em áreas grau B	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno
Estações de fluxo de ar unidirecional em áreas grau C	Semanalmente	Semanalmente	Semanalmente	Semanalmente
Estações de fluxo de ar unidirecional em áreas grau D	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	N/A

Fonte: BRASIL, 2013.

A realização de amostragem volumétrica de ar no início, meio e fim das operações de envase de um produto, assegura melhor qualidade no monitoramento

ambiental e auxilia nas investigações relacionadas com a liberação do produto para uso. Em áreas de graus A e B usadas para envase asséptico, a amostragem em operação é realizada por turno. O fabricante pode a seu critério alterar as frequências de monitoramento para área em repouso, reduzindo-a para mensal ou até mesmo excluindo (BRASIL, 2013).

## **2.8 Media fill**

O processo de envasamento de um produto asséptico é a etapa mais importantes na indústria de medicamentos estéreis, devido ao risco que uma contaminação representa para a segurança do paciente (FDA, 2012).

O Media Fill é uma simulação na qual substitui o produto farmacêutico que seria envasado por meio de cultura estéril, a fim de verificar possíveis contaminações durante a fabricação, para assegurar que a produção de rotina é realizada de maneira segura e eficaz, com sua qualidade necessária. Ele faz parte da validação de um processo de fabricação asséptica (BRASIL 2010b).

Após a realização da simulação, todos os recipientes envasados com meio de cultura, tais como, frascos-ampolas ou ampolas, devem ser incubados durante 14 dias e em salas climatizadas com temperatura de 25°C durante os primeiros 7 dias e após, transferidos para outra sala sob temperatura de 35°C. Como critério de aprovação, não deve haver crescimento microbiano ou se houver, este deve estar dentro de um limite de aceitação considerando o tamanho do lote envasado (TERRA, 2014).

O esperado é que seja realizado no mínimo três simulações de Media fill antes de iniciar um novo envase com o produto farmacêutico ou quando houver alguma modificação no processo de produção do mesmo. Independente desses fatores a realização de Media fill periódico deve ocorrer ao menos uma vez por semestre (TERRA, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância da preservação da saúde e a prevenção de possíveis danos causados por produtos farmacêuticos, faz parte da responsabilidade do profissional da área, o comprometimento desde o início da produção até a dispensação final ao consumidor, no tocante ao controle da qualidade microbiológica destes produtos, principalmente os chamados “medicamentos estéreis”, para assegurar a segurança total do usuário (HEEMANN et al., 2010).

Ao lado da evolução científica e tecnológica dos produtos fabricados, o profissional deve assumir a responsabilidade técnica, por meio do domínio de todo o conhecimento necessário para essa segurança. Essa responsabilidade não poderá mais se restringir à forma oficial de uma imposição legal, mas deverá ser exercida efetivamente com competência, para que o consumidor possa usufruir, com segurança, dos benefícios proporcionados por estes avanços, com o menor grau de risco possível (HEEMANN et al., 2010).

As principais vantagens do controle de qualidade incluem a otimização de processos, redução de tempo e desperdícios, padronização de procedimento operacional padrão (POP), qualidade do ambiente, dos insumos utilizados e dos produtos finais. Contudo os deveres da indústria farmacêutica para com a população estão muito além deste conceito. Garantir a qualidade contínua aliada a um serviço adequado e a um custo acessível se faz necessário (BRASIL, 2000).

Diante do exposto, este trabalho reúne estudos e informações de normas a respeito do controle de qualidade microbiológico em medicamentos estéreis, devido à importância do tema para a segurança e eficácia destes produtos, assim como um fator essencial para saúde pública, visto que a execução das BPF permite a elevação da qualidade dos medicamentos, protege a saúde coletiva, reduz os gastos e oferecer maior segurança, além de ser um quesito obrigatório.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Realizar um levantamento bibliográfico abordando o tema: “Controle de qualidade microbiológico de medicamentos estéreis”, com ênfase nos processos assépticos.

### **4.2 Específicos**

- Destacar a importância do controle de qualidade microbiológico em indústrias farmacêuticas tendo em vista a necessidade de se obter produtos seguros e eficazes.
- Destacar os principais testes microbiológicos realizados no controle de qualidade relacionados a produção de medicamentos estéreis.
- Identificar possíveis fontes de contaminação microbiana nos medicamentos e enfatizar seus impactos.

## 5 METODOLOGIA

A metodologia utilizada para elaborar este trabalho consistiu na realização de um levantamento bibliográfico, tendo como fonte de consulta sites como: Google acadêmico, PubMed, Scielo, Arca (Fiocruz), ANVISA, farmacopeia e livros com edição atualizada.

A pesquisa foi realizada entre os meses de fevereiro de 2018 a março de 2019. Os seguintes termos foram utilizados como palavras-chaves para busca de artigos e normas legislativas: Microbiologia, medicamentos estéreis, medicamentos injetáveis, controle microbiológico, indústria farmacêutica, análise de medicamentos estéreis, monitoramento ambiental, controle de qualidade, análise de água para injetáveis, análise de matéria prima, boas práticas de fabricação, farmacopeia, contaminação microbiana, vigilância sanitária, patógenos, entre outros.

Após a realização da pesquisa, foram selecionados os artigos que compilavam as informações de forma clara e objetiva, descartando os que não se apresentavam dessa forma. Posteriormente os artigos selecionados foram utilizados como base teórica para elaboração deste trabalho.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle de qualidade é uma função essencial da indústria farmacêutica. Os fabricantes de medicamentos devem testar exaustivamente materiais, processos, equipamentos, técnicas, ambientes e pessoal, a fim de garantir que seus produtos finais sejam consistentes, seguros, eficazes e previsíveis. Um problema associado a contaminação de um medicamento pode gerar um impacto negativo que incluirá a perda de vendas de produtos, a diminuição da confiança do cliente, o dano à marca e o nome da empresa e, em muitos casos, processos judiciais.

Os fabricantes de produtos farmacêuticos devem seguir as recomendações da farmacopeia para obter orientação sobre como garantir a qualidade, segurança e benefício dos medicamentos que produzem. A Farmacopeia é uma organização que desenvolve e publica normas para a fabricação de medicamentos com e sem receita médica, além de outros produtos para a saúde. Este é adotado oficialmente pelo País e, por se tratar de um documento oficial, todos os medicamentos produzidos no País, ou importados, são obrigados a adotá-la e seguir os seus procedimentos de controle de qualidade. A não adoção constitui-se em infração sanitária sujeita a penalidades legais (BRANDÃO, 2001).

A contaminação de um medicamento por micro-organismos apresenta-se como um grave problema, devido a possibilidade de trazer riscos para a saúde do consumidor, por conta dos organismos patogênicos, além das alterações do aspecto físico, na cor e odor do produto, tornando-o inviável para utilização. Em 2012, Sutton e Jimenez realizaram uma revisão onde foi conduzida uma análise de 642 *recalls* microbiologicamente relacionados ao longo dos anos 2004 a 2011. A maioria dos *recalls* relatados envolveu produtos estéreis, e desses dispositivos médicos foram responsáveis pela maioria, seguidos por produtos Farmacêuticos e OTC (*Over the Counter*). As razões dadas para *recalls* de produtos estéreis foram variadas, mas a maioria citou “Falta de Garantia de Esterilidade” com embalagem estéril claramente identificada como a principal culpada (SUTTON; JIMENEZ, 2012).

Em 1961 foi publicada a primeira norma internacional sobre salas limpas, Força Aérea Americana. Este ficou conhecida como Manual Técnico TO 00-25-203. Contudo, a Federal Standard 209 foi a norma mais influente, servindo de base, inclusive, para a versão brasileira da NBR ISO 14644-1:1999 (ISO, 1999).

A partir de abril de 2015, a ABNT passou a utilizar esta norma em substituição à antiga NBR 13700 Classificação e Controle de Contaminação.

Segundo FDA, as salas limpas podem ser classificadas como áreas críticas e áreas limpas. Na área crítica os medicamentos esterilizados são expostos a condições ambientais, que devem estar de acordo com o preconizado para manter a esterilidade do produto, assim como na manipulação de medicamentos. As áreas limpas são consideradas locais de apoio e funcionam como ambientes em que componentes não estéreis, produtos formulados, matérias em processamento, equipamento e recipientes/botoques são preparados, mantidos ou transferidos. Segundo a Farmacopeia brasileira, a certificação e a validação do processo e instalações assépticas são realizadas por meio da confirmação da eficiência dos sistemas de filtração; pelos procedimentos de monitoramento microbiológico do ambiente e pela simulação de enchimento asséptico do produto, empregando meio de cultura estéril, conhecido como Media fill (BRASIL, 2010b).

A água é a matéria-prima mais utilizada na produção farmacêutica (PINTO, T.; KANEKO; PINTO, A., 2015). Segundo o Guia de Qualidade para Sistemas de Purificação de Água para Uso Farmacêutico (BRASIL, 2013), o controle de qualidade microbiológico é prioridade, considerando que diversos tipos de micro-organismos patogênicos podem multiplicar-se nos componentes dos sistemas de tratamento e de distribuição da água para uso farmacêutico. Consequentemente, é imperativo minimizar a contaminação microbiológica por meio de tecnologias e ações apropriadas. No Brasil, os requisitos de qualidade da água para uso farmacêutico são estabelecidos em normas técnicas de BPF e também na Farmacopeia Brasileira. É importante ressaltar que, apesar desses documentos serem publicados pela Anvisa, seus conteúdos são baseados de acordo com as recomendações internacionais, fazendo com que estejam em consonância com as tendências mundiais.

A água para injetáveis é empregada como excipiente na preparação de produtos farmacêuticos parenterais de pequeno e grande volume, na fabricação de princípios ativos de uso parenteral, de produtos estéreis e demais produtos que requeiram o controle de endotoxinas. Na tabela 5 estão descritos os parâmetros de qualidade microbiológicos aplicados à água para injetáveis descritos nas farmacopeias brasileira, americana e europeia.

Tabela 5 – Parâmetros microbiológicos para água para injetáveis.

Ensaio	Farmacopeia Americana USP 39 e 40	Farmacopeia Europeia	Farmacopeia Brasileira
Contagem total de Bactérias	< 10 UFC/100mL	< 10 UFC/100mL	< 10 UFC/100mL
Endotoxina (UI/mL)	<0,25 UE/mL	<0,25 UE/mL	<0,25 UE/mL
Análise de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e coliformes	Não solicita a realização de análise	Não solicita a realização de análise	Ausência de <i>Pseudomonas</i> e coliformes.

Adaptado de: BRASIL, 2010b; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2016; USP, 2017.

O controle de qualidade microbiológico é mandatório para liberação de produtos farmacêuticos, sendo de extrema relevância para produtos estéreis. Segundo a Farmacopeia Brasileira, para realizar o teste de esterilidade em produtos farmacêuticos, as amostras devem ser preparadas por meio de assepsia para evitar um possível falso negativo, bem como uma possível contaminação cruzada (BRASIL, 2010b). Os níveis de pirogênios são fundamentais para liberação de produtos farmacêuticos. Os medicamentos estéreis não devem conter pirogênio (PEARSON, 1985).

Os métodos microbiológicos tradicionais são de extrema eficiência e utilidade, e são considerados métodos de referência. Contudo, suas limitações impactam de forma negativa na indústria farmacêutica. Considerando o panorama atual, aguardar cerca de 14 dias ou mais para liberação dos produtos é inviável, considerando os custos e fluxo de mercado. Ademais, os diferentes produtos farmacêuticos apresentam características como a turbidez/opacidade, que representam limitações técnicas frente aos métodos convencionais. A praticidade e a rapidez ofertadas pelos métodos microbiológicos rápidos fazem com que estes métodos, também chamados de métodos alternativos, tenham cada vez mais aceitação entre os órgãos reguladores nacionais e internacionais como ANVISA e o FDA. Segundo BECKER, SKOV e VON EIFF (2009), nos dias de hoje utilizam-se principalmente na indústria farmacêutica uma metodologia manual que utiliza as galerias API e um método automatizado que utiliza o sistema VITEK. Estes métodos atendem de forma muito eficiente à rotina de um laboratório de análises microbiológicas de produtos farmacêuticos.

O monitoramento ambiental é fundamental na prática em BPF. O Teste de Promoção do Crescimento é uma função de controle de qualidade muito importante na indústria farmacêutica. É imperativo estabelecer as propriedades nutritivas do meio de cultura microbiológico que será usado em um procedimento farmacopeico, tal como um teste para microrganismos especificados.

Segundo Amaral (2010), a elaboração de um programa de controle dos pontos críticos de contaminação microbiana é fundamental para garantia da qualidade de um produto farmacêutico. O programa deve incluir o pessoal, produtos de limpeza e desinfecção, local de trabalho, procedimentos operacionais, procedimento de amostragem e análise e demais fatores que influenciam na qualidade do produto final, incluindo o ambiente de produção. A implantação de ambientes controlados por sistemas com filtros retentores de microrganismos é uma tendência que verificamos atualmente nas exigências sanitárias para os segmentos farmacêuticos.

## **7 CONCLUSÃO**

É possível concluir que o controle de qualidade é uma parte essencial da rotina da produção de medicamentos estéreis na indústria farmacêutica. Não é importante apenas para conformidade com os padrões, mas também reduz o risco para o usuário final e, conseqüentemente, para o fabricante. A legislação vigente sobre as BPF, assim como a farmacopeia, representa um aperfeiçoamento das ações de controle sanitário dos produtos, conduzindo a indústria para o desenvolvimento seguro dos medicamentos desenvolvidos. A qualificação profissional, com base na informação das normas e regulamentos, em associação das ferramentas tecnológicas atuais, permite a aplicação integral das boas práticas de fabricação, e, por conseguinte, do controle microbiológico. A importância do controle microbiológico dos produtos farmacêuticos estéreis está ligada não somente a preservação do paciente e preservação do seu estado de saúde, mas também a manutenção das propriedades físico-químicas dos medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14644-1: Salas limpas e ambientes controlados associados – Classificação da limpeza do ar**, 2005.
- AKERS, J. E. Environmental monitoring and control: proposed standards, current practices, and future directions. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 51, n. 1, p.36-47, 1997.
- AMARAL, F. D. **Análise de riscos e pontos críticos de contaminação microbiana na manipulação de produtos e insumos farmacêuticos**. Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade Industrial – ICTQ, 2010.
- ASLUND, B.; OLSON, O. T.; SANDELL, E. Aseptic work under various hygienic conditions. **Acta pharmaceutica Suecica**, v. 14, n. 5-6, p. 517, 1977.
- AVIS, K.; SHUKLA, A. J.; CHANG, R-K. **Coating – Drug Manufacturing Technology Series**. Englewood (CO): IHS Health Group, 1999. 348p.
- BECKER, K.; SKOV, R. L. e VON EIFF, C. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. In: **Manual of Clinical Microbiology**, Eleventh Edition. American Society of Microbiology, p. 354-382, 2015.
- BIOENDO. Disponível em: [http://pt.lalendotoxin.com/usp-standard-gel-clot-tal-in-test-tubes\\_p3.html](http://pt.lalendotoxin.com/usp-standard-gel-clot-tal-in-test-tubes_p3.html). Acesso em: 03 Fev. 2019.
- BIOMERIEUX. Disponível em: <https://www.biomerieux.com.br/biofarmaceutico/vitekr-2-compact?dest=view>. Acesso em: 17 Dez. 2018.
- BRANDÃO, A. **Farmacopéia Brasileira: O Sonho de Crescer**. Pharmacia Brasileira, 2001.
- BRASIL. Congresso da Câmara dos Deputados. **Comissão Parlamentar de Inquérito Destinada a Investigar os Reajustes de Preços e a Falsificação de Medicamentos, Materiais Hospitalares e Insumos de Laboratórios**. Relatório da CPI – Medicamentos: relatório final da Comissão, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 17 de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, DF, Seção 1, 2010a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, Brasília: ANVISA, v. 2, p. 207 - 413, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.**

Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica**, p. 40- 50, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2º Suplemento da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**, p. 37, 2017.

CADWELL JR., G. H. Understanding Hepa Filtration. **Med Dev Diagn Ind**, v.5, n.1, p. 39-42, 1983.

CHARNOCK, C. The microbial content of non-sterile pharmaceuticals distributed in Norway. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 3, p. 233-240, 2004.

DIRECT INDUSTRY. Disponível em: <http://www.directindustry.com/pt/prod/technicis-filtration/product-155536-1675736.html>. Acesso em: 03 FeV. 2019.

EUDRALEX. Manufacture of Sterile Medicinal Products. **EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use**, European Commission, v. 4, 2008.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 9. ed., Strasbourg, **Council of Europe**, v. 1, p. 160 – 169, 2016.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Media Fills for Validation of Aseptic Preparations for Positron Emission Tomography (PET) Drugs**, 2012.

FUKUMORI, N. T. O. *et al.* **Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação.** Tese de Doutorado. Dissertação Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Aplicações. IPEN/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2008.

HEEMANN, A. C. W. *et al.* Guia da profissão farmacêutica - **Indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. Curitiba: CRF-PR, 2010.

HERTROYS, R.; VAN VUGHT, P. A. M. e VAN DE DONK, H. J. M. Moving towards a (microbiological) environmental monitoring programme that can be used to release aseptically produced pharmaceuticals: a hypothesis, a practical programme, and some results. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 52-59, 1997.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION 14644-1, 1999. Disponível em: <http://zoser.com.co/wp-content/uploads/2015/10/ISO%2014644-1%20Version%202015.pdf>. Acesso em: 15 Dez. 2018.

JUANG, D.F.; MORGAN, J.M. The applicability of the API 20E and API rapid net systems for the identification of bacteria from activated sludge. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2001.

LA ROSA, M.C.; MADINA, M.R.; VIVAR C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 3, p. 227-232, 1995.

LONZA. Disponível em: [https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/CH/en/search?text=turbidimetric](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/search?text=turbidimetric). Acesso em: 10 Out. 2018.

LUDWIG, John. Endotoxins, Pyrogens, Lal Testing, and Depyrogenation. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 12, p. 1805-1806, 2001.

MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). **Revista Cubana de Farmacia**, v. 38, n. 1, p. 1-1, 2004.

MERCK MILLIPORE. Disponível em: [https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/industrial-microbiology/3Vyb.qB.B4YAAAE\\_0AZ3.Lxj.nav](https://www.merckmillipore.com/BR/pt/products/industrial-microbiology/3Vyb.qB.B4YAAAE_0AZ3.Lxj.nav). Acesso em: 18 Dez. 2018.

PEARSON, F. C. Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation. New York, NY: **Marcel Dekker**, p. 3-7, 11-14, 23-44, 89- 214, 1985.

PIC/S. Pharmaceutical Inspection Convention. **Recommendation on isolators used for aseptic processing and sterility testing**. PI 014-3. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Pharmaceutical Inspection Convention, 2007.

PINCUS, D. H. Microbial identification using the bioMerieux VITEK® 2 System. **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2018.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2015.

PREISNER, O., GUIOMAR, R., MACHADO, J., MENEZES, J. C.; LOPES, J. A. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics for Differentiation of Salmonella enterica Serovar Enteritidis phage types. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3538-3544, 2010.

SERRANO, S. H. P. *et al.* **Controle Físico Químico e Qualidade de medicamentos**. 1ª ed. Campo Grande, MS: Uniderp, p. 39-54, 2005.

SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S. F. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 271-278, 1990.

SUTTON, S.; JIMENEZ, L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of "Objectionable Organisms". **American Pharmaceutical Review**, v. 15, n. 1, p. 42, 2012.

TERRA, B. H. **MEDIA-FILL**. Programa de Treinamento Contínuo, Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, 2014.

USP. UNITED STATES Pharmacopeia. 40<sup>o</sup> ed. **The United States Pharmacopeia Convention**. Rockville, 2017.

WHYTE, W. **Tecnologia de salas limpas**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

XAVIER, M. P.; VIEIRA, A. A. R. M.; SILVA, A. S. S.; XAVIER, M. A. S. e XAVIER, A. R. E. O. Importância do monitoramento ambiental em áreas classificadas. **Revista de biologia e farmácia**, v. 9, n. 4, p. 1983-4209, 2013.