

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Marcelle Jacomelli Ramos

**AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EM UMA ÁREA  
LIMPA E ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL  
PARA MANIPULAÇÃO DE INJETÁVEIS UTILIZADOS EM TERAPIA  
ANTI-CÂNCER**

Rio de Janeiro

2017

Marcelle Jacomelli Ramos

**AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EM UMA ÁREA  
LIMPA E ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL  
PARA MANIPULAÇÃO DE INJETÁVEIS UTILIZADOS EM TERAPIA  
ANTI-CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Verônica Viana Vieira  
Co- orientador: Dr<sup>a</sup> Priscila da Nobrega Rito

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ramos, Marcelle Jacomelli

Avaliação dos ensaios microbiológicos realizados em uma área limpa e elaboração de um plano de monitoramento ambiental para manipulação de injetáveis utilizados em terapia anti-câncer / Marcelle Jacomelli Ramos. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

174 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Orientador: Verônica Viana Vieira

Co-orientador: Priscila da Nobrega Rito

1. Monitoramento Ambiental. 2. Serviço de Farmácia Hospitalar. 3. Boas Práticas de Manipulação. 4. Vigilância Sanitária. I. Título.

Evaluation of the microbiological tests carried out in a clean room and elaboration of an environmental monitoring plan for the manipulation of injectables used in anti-cancer therapy

Marcelle Jacomelli Ramos

**AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EM UMA ÁREA  
LIMPA E ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL  
PARA MANIPULAÇÃO DE INJETÁVEIS UTILIZADOS EM TERAPIA  
ANTI-CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Maria Helena Simões Villas Boas (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Erica Louro da Fonseca (Doutora)  
Bio-Manguinhos

---

Paulo Victor Pereira Baio (Doutor)  
Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (LQFEx)

---

Verônica Viana Vieira (Doutora) – Orientadora  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Priscila da Nobrega Rito (Doutora) – Co-orientadora  
Instituto de Tecnologia em Fármacos

Dedico este trabalho à minha família,  
que sempre ao meu lado, me deu  
apoio e incentivo para conquistar  
todos os meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, orgulhos da minha vida, por toda dedicação e confiança na busca dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, pelo apoio e compreensão das ausências.

Ao meu namorado pela paciência e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas mestrandos, por transformarem a lembrança do convívio, em saudades.

Aos meus amigos do trabalho pela compreensão das ausências no trabalho.

As minhas Chefes por me incentivarem e viabilizarem essa grande oportunidade na minha vida.

Ao bibliotecário do INCQS, Alexandre, pela orientação nas buscas por referências e formatação do trabalho.

Á Daniele, Bianca e Carol de Biomanguinhos pelo acolhimento e oportunidade de troca de experiências.

Ao professor Sérgio Alves da Silva pela contribuição e orientação no tratamento estatístico do trabalho.

Á Luciane Medeiros, pela imensa generosidade e viabilização da parte experimental da pesquisa no laboratório SEPIN. Devido a isso, tive a oportunidade de conhecer a equipe do laboratório, (Adriana, Luciana, Fernanda, Cristhiane e Joyce), a qual fui recebida com carinho e pude aprender e compartilhar experiências.

Á Tereza da seção SEMEC de Bio-Manguinhos por disponibilizar meio de cultura para a pesquisa.

Á equipe da seção SEEST de Bio-Manguinhos por disponibilizar material estéril para a pesquisa.

Á Nathaly do laboratório LAMEV de Biomanguinhos por disponibilizar os equipamentos para a pesquisa.

Á minha amiga e co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra Priscila Rito pelas palavras de incentivo e contribuição durante o trabalho.

Á minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra Verônica Vieira, pelo acolhimento como sua aluna e acompanhamento deste trabalho. A sua calma foi fundamental nos meus momentos de ansiedade.

"Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!"

Mario Sergio Cortella

## RESUMO

A manipulação de medicamentos injetáveis para tratamento oncológico é uma atividade de grande relevância realizada pela farmácia hospitalar. A manipulação é realizada por técnica asséptica de forma a prevenir a introdução de contaminantes e, por isso, cada etapa do processo de produção deve ser realizada de forma rigorosa e em um ambiente de alta qualidade. A fim de verificar o nível de contaminação desses ambientes de produção, oriundos de diversas fontes como ar, água, materiais, equipamentos e funcionários do processo produtivo, o monitoramento ambiental torna-se uma ferramenta importante em processos assépticos com a finalidade de garantir maior qualidade dos produtos injetáveis. O presente estudo tem como objetivos: avaliar as condutas e os ensaios realizados por uma empresa contratada por um hospital de grande porte para a amostragem de partículas viáveis, comparar os resultados da amostragem realizada pela empresa com os resultados obtidos no estudo, descrever um plano de monitoramento ambiental para a área limpa de manipulação de injetáveis desse hospital, definir os limites de alerta de contaminação das áreas Grau A e C e condutas em caso de desvio. A partir do acompanhamento das práticas de amostragem de partículas viáveis realizada pela empresa contratada, foi possível identificar pontos de fragilidade dos processos e do controle ambiental da área limpa do estudo. Ao comparar os dados foi visto uma maior contaminação nas superfícies amostradas no estudo. Em relação à amostragem ativa do ar, não houve diferença significativa na contagem total de colônias nos resultados obtidos no estudo e pela empresa. A partir do somatório de colônias de bactérias e fungos recuperadas no estudo e pela empresa por amostragem ativa foi verificada a prevalência de fungos na área limpa estudada. Na amostragem passiva do ar, foi visto menor crescimento de colônias totais na sala de manipulação de nutrição parenteral. Na comparação entre o método ativo e passivo em um mesmo local de amostragem na sala de manipulação de medicamentos de suporte, o método ativo apresentou recuperação de micro-organismos muito superior ao resultado da amostragem passiva. Foi elaborado um manual com o plano de monitoramento ambiental, estabelecido os limites de alerta para os ambientes Grau A e C (ar e superfícies) das áreas de manipulação a partir dos dados históricos e ações a serem realizadas em casos de desvio e reincidência do desvio.

Palavras-chaves: Farmácia Hospitalar. Manipulação de Medicamentos Injetáveis. Monitoramento Ambiental. Área Limpa.

## ABSTRACT

The manipulation of sterile pharmaceutical forms for oncological treatment is an activity of vast importance performed by the hospital's pharmacy. The manipulation is done by aseptic technique in order to prevent contamination, therefore, every step of the production process must be done rigorously and in an environment of high environmental quality. In order to verify the level of contamination of these production environments, from different sources such as air, water, materials, equipment and operators involved in the production process, environmental monitoring becomes an important tool in aseptic processes in order to guarantee better quality of injectable products. The present study aims to evaluate: the conducts and tests performed by the company hired by a big hospital for the sampling of viable particles, to compare company and in-house results obtained from this study, to describe an environmental monitoring plan for a sterile preparations cleanroom in this hospital, to define the alert limits of Grade A and C areas and actions of deviations. In the microbiological sampling processes monitoring done by the company was possible to identify fragility points in the environmental control procedures of the study cleanroom. When compared the data, was identified a greater contamination on the surfaces sampled in the study. Regarding to the active air sampling, there was no significant difference in the total colony counting results obtained in the study and by the company. The total colonies of bacteria and fungi recovered in the study and by the company, by active air sampling, showed the predominance of fungi in the studied cleanroom. In the settle air sampling was observed lower growth of colonies in the parenteral nutrition's manipulation room and greater contamination in a point at our "support drug's manipulation room". Comparing active and settle sample methods at the same sampling site in the "support drug's manipulation room", the active method presented higher microorganism's recovery than the settle sampling. The manual was prepared with the environmental monitoring plan and established the alert limit for the grades A and C environments (air and surfaces) of the manipulation areas from historical data and actions to be carried out in cases of deviation and its recidivism.

Key-words: Hospital Pharmacy. Manipulation of Injectable drugs. Environmental monitoring. Cleanroom.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultados das amostragens em dois pontos na sala de manipulação de quimioterápicos (meses de janeiro e fevereiro de 2016) e o registro de umidade e de temperatura no período.....	77
Gráfico 2	Resultados de amostragem em dois pontos na sala de manipulação de quimioterápicos no mês de março de 2016 e o registro de umidade e de temperatura no período.....	78
Gráfico 3	Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 23a.....	83
Gráfico 4	Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 12a e o registro de umidade e de temperatura.....	84
Gráfico 5	Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 13a e o registro de umidade e de temperatura.....	84
Gráfico 6	Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 15a.....	85
Gráfico 7	Comparação da recuperação de colônias pela amostragem passiva no ponto 5p e 6p da sala de manipulação de medicamentos de suporte.....	88
Gráfico 8	Análise de tendência de contaminação de um ponto (12a) na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos.....	104

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Antecâmara tipo cascata.....	36
Figura 2	Antecâmara tipo bolha.....	37
Figura 3	Placa com meio SBD amostrada no estudo com crescimento confluyente (referente ao ponto 13a).....	86

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação entre os diferentes sistemas de classificações de área limpa.....	32
Quadro 2	Número máximo de partículas em suspensão no ar permitido para condições “em repouso” e “em operação” .....	33
Quadro 3	Número máximo de partículas viáveis permitidas para cada tipo de monitoramento durante o processo de produção.....	33
Quadro 4	Especificação dos principais ensaios para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.....	39
Quadro 5	Frequência e estado de ocupação para a realização dos principais ensaios para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.....	40
Quadro 6	Periodicidade mínima para limpeza e manutenção dos componentes do sistema Heating, Ventilation, air Conditioning (HVAC).....	40
Quadro 7	Frequência de amostragem de partículas totais no monitoramento ambiental.....	43
Quadro 8	Frequência de amostragem de partículas viáveis em áreas de processamento asséptico sugerida pela Anvisa.....	58
Quadro 9	Frequência de amostragem em áreas de processamento asséptico sugerida pela Farmacopeia Americana.....	58
Quadro 10	Número máximo de partículas viáveis para cada tipo de monitoramento durante o processo de produção.....	97
Quadro 11	Frequência de amostragem de partículas totais e viáveis sugeridas pela Anvisa.....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da recuperação de colônias totais obtidas na amostragem ativa do ar na área de manipulação de medicamentos de suporte, realizada no estudo e pela empresa.....	81
Tabela 2	Comparação da recuperação de colônias de bactérias e fungos na amostragem ativa do ar na área de manipulação de medicamentos de suporte, realizada no estudo e pela empresa.....	81
Tabela 3	Somatório de colônias de bactérias e fungos nas amostragens realizadas no estudo.....	87
Tabela 4	Limites de alerta de contaminação do ar, por ponto de amostragem (amostragem ativa) e das superfícies da área limpa....	102
Tabela 5	Limites de alerta de contaminação do ar, por sala (amostragem ativa) e das superfícies da área limpa.....	103

## LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASHP	American Society of Health System Pharmacist
A.S.P.E.N	American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Practice Recommendations
BBCA	British Columbia Cancer Agency
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BPM	Boas Práticas de Manipulação
BPPTA	Boas Práticas de Preparação da Terapia Antineoplásica
°C	Graus Celsius
CAPA	Ações corretivas e preventivas
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CPD	Contador de partículas discretas
CSB	Cabine de Segurança Biológica
DEGAQ	Departamento da Garantia de Qualidade da empresa Bio-Manguinhos
EFU	Equipamento de Fluxo Unidirecional
EU GMP	EU Guidelines to Good Manufacturing Practice – Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products
FDA GMP	FDA Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice
FS 209	Federal Standard 209
GMP	Good Manufacturing Practice
HEPA	High Efficiency Particulate Air
HVAC	Heating, Ventilation, air conditioning
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEST	Institute of Environmental Sciences and Technology
INCA	Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva
ISO	International Organization for Standardization
ISOPP	International Standards of Practice Safe Handling of Cytotoxics
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação

m <sup>3</sup>	Metro cúbico
mm	Milímetro
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
Pa	Pascal
PDA	Parenteral Drug Administration
PMOC	Plano de Manutenção, operação e controle
POP	Procedimento operacional padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RODAC	Replicate Organism detection and Counting
SBD	Sabouraud Dextrose
SEEST	Seção de lavagem e esterilização de materiais
SEMEC	Seção de Meio de Cultura
SEPIN	Seção de Esterilidade, Processos e Insumos
SOBRAFO	Sociedade Brasileira de farmacêuticos em Oncologia
SUS	Sistema Único de Saúde
TSA	Ágar tripticaseína de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
US FDA	United States Federal Drug Administration
USP	United States Pharmacopeia
VBNC	Viable But Non-Culturable
WHO	World Health Organization
µm	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 O CÂNCER E O PAPEL DE UM HOSPITAL NO TRATAMENTO ONCOLÓGICO.....	20
1.2 TERAPIA ANTI-CÂNCER.....	21
1.3 MANIPULAÇÃO DE SOLUÇÕES INJETÁVEIS.....	22
1.4 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O PAPEL REGULADOR SOBRE A MANIPULAÇÃO MAGISTRAL E OFICINAL.....	23
1.5 LEGISLAÇÕES SOBRE BOAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE INJETÁVEIS.....	25
1.6 ÁREA LIMPA.....	29
1.6.1 Legislação e normas para classificação de área limpa.....	30
1.6.2 Parâmetros de um sistema de área limpa.....	33
1.6.2.1 Sistema de filtragem.....	34
1.6.2.2 Número de trocas de ar e distribuição do ar.....	34
1.6.2.3 Diferencial de pressão.....	35
1.7 REQUALIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS TOTAIS NO AMBIENTE.....	37
1.7.1 Plano de monitoramento de partículas não viáveis.....	41
1.7.1.1 Contagem de partículas.....	41
1.7.1.2 Diferencial de pressão.....	43
1.7.1.3 Temperatura e umidade relativa.....	44
1.8 MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NO AMBIENTE.....	44
1.8.1 Plano de monitoramento microbiológico.....	47
1.8.1.1 Amostragem do ar.....	48
1.8.1.1.1 Amostragem ativa do ar.....	48
1.8.1.1.2 Amostragem passiva do ar.....	49
1.8.1.2 Amostragem da superfície.....	50
1.8.1.3 Análise dos funcionários.....	52
1.8.1.4 Meios de cultura e período de incubação.....	54
1.8.1.5 Plano e frequência de amostragem.....	56
1.9 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS E PREVENTIVAS.....	59
1.10 JUSTIFICATIVA.....	59

<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	61
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	62
3.1 AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE AMOSTRAGEM DE PARTÍCULAS VIÁVEIS REALIZADA PELA EMPRESA PRESTADORA DE SERVIÇO E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OS DO ESTUDO.....	62
3.1.1 Realização da amostragem de partículas viáveis no estudo.....	62
3.1.2 Materiais utilizados nas amostragens realizadas no estudo.....	64
3.1.3 Amostragem ativa do ar.....	64
3.1.4 Amostragem passiva do ar.....	65
3.1.5 Incubação das amostras.....	65
3.1.6 Análise estatística dos resultados da amostragem do ar realizadas no estudo e pela empresa.....	66
3.2 ESTABELECIMENTO DOS LIMITES DE ALERTA E PROPOSTA DE AÇÕES NO CASO DO RESULTADO NO MONITORAMENTO AMBIENTAL EXCEDER O LIMITE DE ALERTA.....	67
3.3 ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	68
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
4.1 AVALIAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DAS PRÁTICAS DE AMOSTRAGEM MICROBIOLÓGICA REALIZADA PELA EMPRESA PRESTADORA DE SERVIÇO.....	71
4.2. REALIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM MICROBIOLÓGICA NO PRESENTE ESTUDO E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS PELA EMPRESA.....	76
4.2.1 Amostragem ativa do ar .....	76
4.2.1.1 Avaliação dos resultados da análise do ar realizados pela empresa .....	76
4.2.1.2 Avaliação dos resultados da análise do ar realizados no estudo.....	78
4.2.2 Amostragem passiva do ar .....	87
4.3 ESTABELECIMENTO DOS LIMITES DE ALERTA E A ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL .....	95
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	106
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	108

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO A- PLANTA BAIXA DA ÁREA LIMPA COM OS PONTOS DE AMOSTRAGEM ATIVA DO AR.....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO B - PLANTA BAIXA DA ÁREA LIMPA COM OS PONTOS DE AMOSTRAGEM PASSIVA DO AR.....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE A - PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL DE UMA ÁREA LIMPA DE MANIPULAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTI-CÂNCER, DE SUPORTE E NUTRIÇÃO PARENTERAL.....</b>	<b>122</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O CÂNCER E O PAPEL DE UM HOSPITAL NO TRATAMENTO ONCOLÓGICO

Segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. A magnitude de ocorrência de alguns tipos de cânceres em países em desenvolvimento se assemelha a dos países desenvolvidos, como os relacionados à próstata, à mama e ao intestino. Entretanto, nos países em desenvolvimento ainda configura-se os cânceres relacionados com condições socioeconômicas menos favoráveis, como o do colo do útero e o do estômago (INCA, 2016b).

No Brasil, a estimativa para adultos para o ano de 2016 e 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer. Os principais tipos incidentes, exceto o câncer de pele não melanoma, são próstata e pulmão para os homens e mama e intestino para as mulheres (INCA, 2016b).

O câncer infanto-juvenil (doença que acomete crianças e adolescentes até 19 anos de idade) é considerado raro quando comparado com os tumores de adulto, correspondendo entre 1% a 3% de todos os tumores malignos. Representa a segunda causa de óbito nos países desenvolvidos (4-5%) e, nos países em desenvolvimento (1%) ficando atrás dos óbitos por doenças infecciosas. Em 2013, no Brasil, foram notificadas 2.800 mortes por neoplasia infanto-juvenil, sendo considerada a doença de maior letalidade. Nos países em desenvolvimento, a leucemia é o tipo mais comum, seguido de linfoma e tumores do sistema nervoso central e tumores embrionários. No Brasil, são estimados para o ano de 2016, mais de 12.000 casos novos de câncer nessa população (INCA, 2016b).

O hospital desse estudo oferece tratamento para diversos tipos de tumores sólidos e hematológicos. Possui uma área limpa denominada Central de Preparo de Medicamentos Injetáveis inserida dentro da seção de Farmácia. Essa Central se destina ao preparo de nutrição parenteral e medicamentos anti-câncer – quimioterápicos antineoplásicos e imunobiológicos (anticorpos monoclonais e Bacilos de *Calmette-Guérin* (BCG)) - e de suporte à terapia oncológica (hidratações venosas, antieméticos, corticoides, anti-histamínicos, soluções analgésicas). A

manipulação é realizada por 17 profissionais farmacêuticos e 13 técnicos de farmácia em equipamentos de fluxo unidirecional vertical e horizontal (Grau A), inseridas em ambientes classificados Grau C, rodeadas por áreas Grau D. No ano de 2016, a média mensal de manipulação na Central de Preparo de Medicamentos Injetáveis, foi de 145 bolsas de nutrição parenteral, 3.700 unidades de antineoplásicos, 3.400 unidades de medicamentos de suporte e 10 seringas de BCG.

## 1.2 TERAPIA ANTI-CÂNCER

A terapia anti-câncer inclui agentes quimioterápicos, biológicos, terapia alvo molecular, radioterapia, cirurgia e oncologia intervencionista. O uso combinado dos medicamentos, a poliquimioterapia e a associação de diferentes modalidades de tratamento têm o objetivo de causar ação sinérgica, evitar o desenvolvimento de resistência celular aos fármacos empregados e promover melhor resposta ao tratamento (HICKEY et al, 2013).

Além da terapia com os medicamentos que agem diretamente no combate à doença, há outros que são empregados no manejo das toxicidades causadas pelos medicamentos anti-câncer - antieméticos, protetores urinários, corticoides e hidratação venosa, incluindo, quando indicado, transfusões de hemácias e plaquetas, antibióticos e fatores de crescimento. O emprego desses fármacos é fundamental para favorecer a adesão do paciente ao tratamento, evitar a complicação médica e, como consequência, o risco à vida do paciente (HAMADANI et al, 2007, GILBAR; RIDGE, 2002).

Pacientes com câncer precisam de suporte nutricional desde o momento do diagnóstico. A perda de peso, geralmente, é o primeiro sintoma da doença, podendo acometer de 30 a 80% dos pacientes com câncer, dependendo do sítio primário do tumor e estadiamento da doença (BOZZETTI et al, 2009). Durante todas as fases do tratamento, antes e após procedimentos cirúrgicos, quimioterapia e radioterapia, o paciente deve ser avaliado quanto ao estado nutricional a fim de assegurar o tratamento, controlar alguns efeitos adversos proveniente da terapia antitumoral e

melhorar a qualidade de vida do paciente a fim de diminuir as taxas de morbidade e mortalidade (WAITZBERG, 2011, BOZZETTI et al, 2009).

Muitos pacientes, principalmente de tumor sólido, podem desenvolver ao longo do tratamento, anorexia – caquexia, uma síndrome multifatorial e progressiva na qual há contínua perda de massa muscular esquelética associada ou não a perda de massa gorda, impactando de forma negativa na definição do tratamento e na qualidade de vida do paciente. A intervenção nutricional com o uso de via oral e enteral associada a medicamentos é preferencial nesse tipo de tratamento, porém, em pacientes desnutridos e impossibilitados de fazer a ingesta por essas vias, a via parenteral torna-se fundamental (WAITZBERG, 2011, BOZZETTI et al, 2009, ROSANIA et al, 2015). A nutrição por via parenteral é empregada principalmente para os pacientes com doença irremediável ou quando o paciente apresenta o trato gastrointestinal não funcional, debilitado ou inacessível. Apresenta como vantagem o fornecimento rápido e fácil de nutrientes uma vez que o acesso venoso é estabelecido, porém, aumenta a chance de riscos e complicações infecciosas (ROSANIA et al, 2015). Os componentes empregados na formulação da mistura nutricional (aminoácidos, glicose, solução lipídica, eletrólitos, vitaminas e água para injeção), o tempo necessário para o preparo de cada bolsa e a complexidade da manipulação asséptica, faz da nutrição parenteral, uma preparação de médio risco para contaminação microbiológica (CURTIS; SACKS, 2009, USP, 2016c).

O uso do agente biológico, BCG, tem se tornado uma prática na farmácia hospitalar. A administração de BCG por via intravesical representa a primeira escolha no tratamento do câncer de bexiga não invasivo. É empregado no tratamento da doença de nível intermediário e alto risco, com objetivo de evitar a sua recorrência e progressão (RYK et al, 2015). Em 1969, teve início o uso do BCG, na clínica, para tratamento de leucemia linfoblástica. No tratamento de câncer de bexiga, a aprovação da indicação foi feita em 1990, pela *United States Federal Drug Administration* (US FDA), após a definição dos efeitos adversos locais e toxicidade sistêmica (HERR; MORALES, 2008).

### 1.3 MANIPULAÇÃO DE SOLUÇÕES INJETÁVEIS

A manipulação de medicamentos injetáveis é uma atividade de grande relevância e de alta complexidade desenvolvida pela farmácia hospitalar (ASHP, 2014). Por lei, as soluções manipuladas são para uso extemporâneo, ou seja, a infusão da solução deve ser finalizada até 48 horas a partir do preparo (ANVISA, 2007).

A manipulação de injetáveis tem o objetivo de atender às necessidades específicas e individuais dos pacientes, principalmente da população pediátrica, geriátrica e dos pacientes que necessitam de restrição hídrica ou ajustes de doses. A individualização das formulações na área da oncologia e da nutrição parenteral, formulações essas com misturas de componentes complexos e tóxicos, contribuíram de forma significativa para a evolução da atividade de manipulação pelas farmácias (GUDEMAN et al, 2013, MYERS, 2013, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A manipulação é realizada por técnica asséptica através da reconstituição, diluição e transferência de pequenos e grandes volumes de soluções estéreis para bolsas ou seringas de infusão de forma a prevenir a introdução de contaminantes principalmente de origem biológica (MYERS, 2013, USP, 2016c). Esse tipo de contaminação está relacionado à introdução de micro-organismos nas soluções estéreis durante o processo de manipulação proveniente de diversas fontes como o ar, água, instalações, equipamentos, utensílios e pessoal (ANVISA, 2010, SHINTANI, 2015b), podendo causar severos danos à saúde do paciente em termos de morbidade e mortalidade.

Em um processo asséptico, cada material envolvido na produção deve ser estéril para garantir um produto final de mesma qualidade. Logo, é necessário que o processo de produção ocorra em um ambiente de alta qualidade e que cada etapa da produção esteja bem descrita, validada e controlada (FDA, 2004).

#### 1.4 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O PAPEL REGULADOR SOBRE A MANIPULAÇÃO MAGISTRAL E OFICINAL

A partir de 1990, com a criação da Lei Orgânica da Saúde e criação do Sistema Único de Saúde (SUS), o Estado passa a ser o responsável em promover o

acesso universal e igualitário às ações e aos serviços de saúde para a sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1990). O SUS é considerado uma das principais conquistas na política de saúde na história do país destacando e consolidando a importância das ações da vigilância sanitária a fim de proteger e promover à saúde com enfoque no risco (MAIA; GUILHEM, 2015).

Em 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criada, e passa a ter, como um dos seus objetivos, a regulação e fiscalização de substâncias e insumos de interesse da saúde e participação na produção de medicamentos, equipamentos, imunobiológicos e hemoderivados, visto que o acesso à saúde integral perpassa não só pelo acesso aos serviços de saúde, mas também pelo acesso aos insumos e medicamentos com qualidade, segurança e eficácia terapêutica (COSTA, 2013). A Anvisa tem como missão precípua a prevenção de agravos à saúde, esta deve ser realizada através da ação reguladora de garantia da qualidade de produtos e serviços, que inclui a aprovação de normas e suas atualizações, bem como a fiscalização de sua aplicação. Esta agência pode adotar certas ações, corroborando para que somente produtos com qualidade cheguem ao consumidor (RITO, 2013).

O aumento do consumo de medicamentos magistrais no Brasil, a partir de 1980, foi desencadeado pelo preparo de medicamentos em apresentações já disponíveis no mercado pela indústria farmacêutica, deixando em segundo plano o conceito de atender a uma demanda específica e de produzir em caráter complementar à indústria. Com esse crescimento de consumo e ausência de regulamentação específica, surgem as denúncias de problemas sanitários e casos de intoxicação, falha terapêutica e até morte, gerando grande insegurança quanto à qualidade desses produtos tanto pelo órgão regulatório quanto pela sociedade (BONFILIO et al, 2010, SILVA et al, 2010).

Em 1988, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) do MS publicou a Portaria N° 272, de 8 de abril, que aprova o 1º Regulamento Técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Parenteral e em 2000, a Anvisa publicou o primeiro regulamento técnico de Boas Práticas de Manipulação (BPM) para farmácias magistrais - a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 33, de 19 de abril, considerada um marco na evolução magistral, porém, não capaz de conscientizar os profissionais quanto às questões relacionadas à qualidade (BONFILIO et al, 2010). Em 2003 foi estabelecida a RDC N° 354, de 18 de

dezembro, a qual estabelece critérios específicos para a manipulação magistral de substâncias de baixo índice terapêutico. Em 2006, a RDC N° 33/2000 foi atualizada e substituída pela RDC N° 214, de 18 de dezembro, que posteriormente foi revogada pela RDC N° 67, de 8 de outubro de 2007 (BONFILIO et al, 2010). Em 2008, a Anvisa publicou a RDC N° 87, de 21 de novembro, alterando alguns itens da RDC N° 67/2007, a qual se encontra em vigor. Essa Resolução resultou no aumento do rigor com relação aos requisitos mínimos exigidos para o preparo dos medicamentos, que atinge questões relacionadas à todas as etapas de produção como instalações e equipamentos adequados, recursos humanos suficientes e capacitados, controle de qualidade dos excipientes e do produto final, armazenamento, avaliação farmacêutica da prescrição, manipulação, conservação, transporte, dispensação das preparações e atenção farmacêutica visando à garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto de forma a promover o uso seguro desses medicamentos à população (ANVISA, 2007).

As exigências cada vez maiores da qualidade no preparo dos medicamentos magistrais geram polêmicas quanto ao custo necessário para realizar todos os processos de controles de qualidades exigidos durante as etapas de produção e a limitação de recursos financeiros quando comparado aos da indústria farmacêutica, criando a sensação da oferta à população de um medicamento com menor rigor de qualidade (BONFILIO et al, 2010).

## 1.5 LEGISLAÇÕES SOBRE BOAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO DE INJETÁVEIS

O preparo de soluções estéreis deve seguir as BPM de medicamentos (ANVISA, 2007). No Brasil, as legislações que regulamentam o preparo de soluções injetáveis em farmácias são a Portaria N° 272, de 8 de abril de 1998 da SNVS do MS que fixa os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Parenteral, a Resolução RDC N° 220, de 21 de setembro de 2004, que determina o regulamento técnico de funcionamento para os serviços de terapia antineoplásica e a Resolução RDC N° 67/2007 que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações

Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias, ambas da Diretoria Colegiada da Anvisa.

A portaria Nº 272/1998 descreve a infraestrutura física e mobiliários permitidos na área de manipulação de nutrição parenteral a fim de facilitar o processo de limpeza e desinfecção, determina que a manipulação deve ser realizada em equipamentos de fluxo laminar em um ambiente Grau A circundada por área Grau C, assim como a necessidade de haver diferenças de pressão entre os ambientes e as salas em uma área limpa. O equipamento de fluxo laminar deve ter pressão positiva, assim como a sala de manipulação, a fim de evitar a entrada de partículas no equipamento ou na sala de manipulação. A área deve ser dotada de sistema de trava nas portas das câmaras para que não haja abertura simultânea. Esta portaria exige a necessidade de um programa de manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos e a validação e monitoramento do controle ambiental da área de manipulação (BRASIL, 1998).

A Resolução Nº 220/2004 estabelece as orientações gerais para as Boas Práticas de Preparação da Terapia Antineoplásica (BPPTA) com ênfase na análise da prescrição médica, preparação, transporte e descarte da terapia antineoplásica. Determina que a manipulação de antineoplásicos injetáveis deve ser realizada em cabine de segurança biológica (CSB) classe II B2, com validação semestral e manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos, além de procedimentos de limpeza e desinfecção das superfícies e equipamentos. Porém, não deixa claro quais ensaios necessários para validação e certificação da CSB, não faz exigência quanto à classificação das áreas adjacentes à CSB e de um programa de monitoramento ambiental.

O preparo de medicamentos antineoplásicos injetáveis requer cuidados de biossegurança associados ao processo de manipulação (ASHP, 2006) segundo a *National Institute for Occupational and Safety Health* (NIOSH), os antineoplásicos são classificados como medicamentos de risco, capazes de causar genotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade ou outra toxicidade no desenvolvimento fetal, toxicidade reprodutiva e toxicidade a órgãos em baixas doses (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Em 1990, a *American Society of Health System Pharmacists* (ASHP) publicou o primeiro boletim com recomendações no manuseio seguro de drogas citotóxicas e de risco. Contínuos relatos de contaminação no local de trabalho e a preocupação com a saúde do trabalhador

levaram a *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA), em 1995, a emitir novas orientações sobre o controle ocupacional à exposição a drogas de risco e, em 2004, a NIOSH emitiu o “Alerta NIOSH: prevenção à exposição ocupacional aos antineoplásicos e drogas de risco e outras definições” (ASHP, 2006).

A partir de 1996, a manipulação de medicamentos antineoplásicos realizada, até então por profissionais de enfermagem, foi determinada pelo Conselho Federal de Farmácia como atividade privativa do farmacêutico assim como o preparo dos demais medicamentos que possam causar risco ocupacional ao manipulador (CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA, 2012, BRASIL, 2004), possibilitando o preparo de um produto mais seguro e com maior qualidade para o paciente. Contudo, questões relacionadas à exposição ocupacional e à contaminação ambiental não foram resolvidas de modo satisfatório, como mostram várias publicações (DAVIS; MCLAUCHLAN; CONNOR, 2011, BOIANO; STEEGE; SWEENEY, 2014). Nesses estudos, foi demonstrada a presença de traços de agentes antineoplásicos na urina de profissionais de saúde envolvidos no preparo e administração destes medicamentos (YOSHIDA et al, 2010, FRANSMAN et al, 2007), assim como a presença de resíduos químicos nas superfícies de trabalho (CHU et al, 2011, SCHIERL; BOHLANDT; NOWAK, 2009), superfície externa dos frascos dos medicamentos (FLEURY-SOUVERAIN et al, 2014, TOUZIN et al, 2008;) e na área de armazenamento (SCHIERL; BOHLANDT; NOWAK, 2009).

A resolução Nº 67/2007 classifica as atividades desenvolvidas pela farmácia em seis grupos e determina as disposições a serem realizadas para atender as BPM tanto no serviço público quanto no privado (BRASIL, 2007). O anexo III da resolução fixa os requisitos mínimos exigidos para a manipulação de medicamentos à base de hormônios, antibióticos, citostáticos e substâncias sujeitas a controle especial, e o anexo IV fixa os requisitos mínimos relativos à manipulação de preparações estéreis em farmácias, não contemplando a manipulação de nutrição parenteral, enteral e concentrado polieletrólítico para hemodiálise. Essa resolução complementa as exigências da RDC Nº 220/2004 e estabelece a classificação de ambientes em relação ao número de partículas totais para a manipulação de antineoplásicos injetáveis e medicamentos estéreis. Estabelece também as diferenças de pressão entre as salas de manipulação, antecâmara e sala de limpeza e desinfecção de material, determina que a sala de manipulação de medicamentos antineoplásicos deve ter uma pressão inferior às demais a fim de evitar que qualquer aerossol

formado na sala de manipulação escape para outra sala, reduzindo o risco de exposição ambiental e ocupacional. Diferente do que é estabelecido para manipulação de medicamentos estéreis que não oferecem risco, em que a pressão da sala de manipulação deve ser positiva para que nenhum contaminante externo entre na sala de manipulação. Exige qualidade de água para injetáveis utilizada no processo de manipulação e necessidade de um programa de monitoramento ambiental para garantir a qualidade do processo produtivo quanto ao número de partículas viáveis e não viáveis (BRASIL, 2007), porém não orienta quanto aos ensaios a serem executados, a frequência e os limites aceitáveis.

No Brasil, não há uma legislação específica que oriente quanto à manipulação de BCG em farmácias, contudo, por ser um produto para uso com qualidade de injetável, faz-se aderência aos princípios das Boas Práticas de Preparo de Medicamentos, com necessidade de instalações exclusivas e controle rigoroso dos processos em todas as etapas da manipulação. Embora, este medicamento não ofereça risco ocupacional, algumas diretrizes internacionais NIOSH, *British Columbia Cancer Agency* (BBCA) e *Guidelines for South Australian Health Services*, recomendam práticas seguras de manuseio a fim de evitar contaminação cruzada com outros medicamentos e infecção nos pacientes oncológicos imunocomprometidos.

Foi abordada apenas a legislação sanitária brasileira que define os requisitos mínimos necessários para o exercício das atividades de manipulação em farmácias, ficando claro, portanto, que é permitida a utilização de sistemas mais complexos, baseados no modelo industrial, visando a qualidade do produto preparado. Além disso, órgãos regulamentadores internacionais e associações de profissionais da área passaram a estabelecer protocolos e guias com orientações a fim de se obter um conjunto de ações voltadas para a prevenção, controle ou eliminação dos riscos inerentes à atividade de manipulação e conseqüentemente reduzir o risco de exposição ocupacional, contaminação do ambiente e do produto – *The American Society of Health-System Pharmacists* (ASHP), *International Standards of Practice Safe Handling of Cytotoxics* (ISOPP), *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition Practice Recommendations* (A.S.P.E.N.) e Sociedade Brasileira de farmacêuticos em Oncologia (SOBRAFO).

A legislação brasileira que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos em nível industrial é a Resolução RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010.

Essa resolução abrange conceitos de garantia de qualidade, qualificação de sistemas, validação de processo, controle de qualidade, ensaios para o monitoramento microbiano periódico durante o processo asséptico assim como os limites aceitáveis para contaminação microbiana (ANVISA, 2010).

Os elementos que fazem parte da garantia da qualidade estão presentes nas indústrias farmacêuticas e têm um papel fundamental durante todas as etapas de produção a fim de garantir a esterilidade do produto final. A garantia de qualidade em um processo asséptico é uma ferramenta proativa, com rigoroso monitoramento e registros dos ensaios quanto à estrutura física da área limpa (instalação e equipamento) e processos como calibração dos equipamentos, treinamento dos funcionários, validação de processos, monitoramento ambiental, controle de qualidade laboratorial e agilidade nas ações corretivas (SHINTANI, 2015b).

## 1.6 ÁREA LIMPA

Área limpa é uma área física restrita e apropriada com controle rigoroso de partículas, temperatura, umidade e com grau de diferenciação de pressão entre as salas. Deve ser projetada, construída e utilizada de forma a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas viáveis e não viáveis, fornecendo um ambiente de qualidade para a produção de soluções estéreis (FARMACOPEIA..., 2010).

A redução de partículas totais (viáveis e não viáveis) em uma área limpa é atribuída principalmente ao sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado (HVAC – *heating, ventilation, air conditioning*). O sistema HVAC é um complexo sistema de tratamento de ar e contém como parte da sua estrutura uma unidade de tratamento de ar (UTA) que consiste de ventilador mecânico, elementos de aquecimento, resfriamento, elementos de filtragem, atenuadores de ruído, grelhas de admissão, saídas de ar, dutos de captação, distribuição e retorno do ar. A manutenção de todos esses componentes é fundamental para o pleno desempenho do sistema de tratamento de ar em uma área limpa (ANVISA, 2013).

O sistema HVAC permite o controle da temperatura e umidade garantindo condições necessárias ao bom desempenho dos equipamentos, auxílio no controle

de micro-organismos, manutenção da qualidade dos materiais e produtos e conforto aos funcionários (ANVISA, 2013).

Os dois principais projetos de área limpa são classificados de acordo com o tipo de insuflamento de ar filtrado na área de produção. O insuflamento pode ser o de fluxo unidirecional ou o turbulento, em que o fluxo de ar após passar por filtros *High Efficiency Particulate Air* (HEPA), é distribuído através de difusores localizados no teto da área limpa. O insuflamento do ar tipo turbulento é empregado em classificações de ambientes menos rigorosos como Grau B, C e D. Esse tipo de distribuição promove a diluição do ar impregnado por partículas com o ar limpo insuflado, de forma a homogeneizar o ar do ambiente de trabalho tornando-o dentro de uma concentração aceitável de partículas para as atividades ali executadas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; WHYTE, 2003).

O insuflamento do ar em uma única direção e em paralelo fornece o fluxo unidirecional ou laminar que pode ser vertical ou horizontal. É empregado em áreas com necessidade de baixa concentração de partículas, como em ambientes Grau A. Por serem sistemas mais caros, pode-se utilizar módulos ou equipamentos de fluxo laminar, que são microambientes e seguem os mesmos critérios e parâmetros de uma área limpa (ABDOU; PEYTON, 1995; WHYTE, 2003).

Além do sistema de tratamento de ar, outra forma de controlar o número de partículas em uma área limpa é através da execução de um projeto bem planejado e da utilização de materiais corretos no acabamento das instalações, como por exemplo, janelas e luminárias vedadas, superfícies lisas e impermeáveis, cantos arredondados a fim de evitar acúmulo de partículas e facilitar a limpeza e desinfecção, pias e ralos devem ser evitados e não devem existir nas áreas de manipulação. Estabelecer procedimentos escritos a fim de manter padrões de limpeza rigorosos, avaliar condutas e práticas de trabalho dos funcionários e restringir o número de pessoas e materiais permitindo a entrada somente através de câmaras de passagem com sistema de trava nas portas para que não haja abertura simultânea das mesmas e não haja deslocamento de ar entre os ambientes (ANVISA, 2010, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

#### 1.6.1 Legislação e normas para classificação de área limpa

Há diversas normas, legislações e Guias de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos normalmente utilizados para a classificação de áreas limpas – *FDA Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice* (FDA, 2004), *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice – Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products* (EUROPEAN COMMISSION, 2008), *Good Manufacturing Practices for Sterile Products* (WHO, 2011) e *International Organization for Standardization* (ISO, 2015a).

A primeira classificação de área limpa foi a *U.S Federal Standard 209* (FS 209) desenvolvida pelo *Institute of Environmental Sciences and Technology* (IEST). Essa norma foi revisada (FS 209-E) e, em 2001, foi cancelada e substituída pela ISO 14644, a fim de torná-la um padrão de referência internacional na classificação de áreas limpas (ENSOR, 2014, KRIPPNER, 2009). Em 2015, a ISO 14644 foi revisada e subdividida em 10 partes, as quais definem a classificação dos ambientes quanto ao número de partículas totais e concentração química, especificações para ensaios, métodos de ensaio, técnicas de projeção e construção, procedimentos operacionais para verificação da qualidade do ar e classificação de limpeza da superfície pela concentração de partícula total e química (ISO, 2015a).

Atualmente a classificação ISO 14644 parte 1 é utilizada mundialmente devido à unidade de medida de volume ser em m<sup>3</sup> em substituição ao pé<sup>3</sup> adotado pela FS 209-E (WHYTE, 2003). A classificação de uma área limpa é baseada no limite máximo de concentração de partículas de um determinado diâmetro por m<sup>3</sup> de ar (ISO, 2015a).

A ISO 14644 por não ser uma norma específica para indústrias farmacêuticas é utilizada como referência em áreas limpas para as indústrias de biotecnologia, alimentos, microeletrônica e espacial. Isso permite que áreas limpas com diferentes finalidades sigam a mesma especificação técnica e de desempenho e tenham os mesmos critérios de avaliação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Porém, a ISO 14644, diferentemente dos outros guias de classificação de ar (EU GMP, WHO GMP TRS 961 e FDA GMP), não estabelece os níveis de carga microbiana (partículas viáveis), critério importante para a indústria farmacêutica. Além disso, não define os limites para as partículas em suspensão no ar quanto aos estados ocupacionais “em repouso” e em “operação” (ANVISA, 2013, KRIPPNER, 2009), por isso, esses guias

continuam a ser utilizados como referência para a produção asséptica em área limpa (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, WHYTE, 2003).

O Quadro 1 correlaciona as classes ISO 14644-1 com outras classificações de área limpa "em repouso". O número máximo de partículas em suspensão no ar permitido para condições "em repouso" e "em operação" está definido no Quadro 2. O Quadro 3 correlaciona a classificação da área com os limites máximos aceitáveis de partículas viáveis de vários guias e normas de boas práticas de produção.

Cada etapa do processo de produção de estéreis exige uma classificação da área conforme a atividade desempenhada e o Grau de risco de contaminação do produto decorrente dessa atividade (ANVISA, 2010, EUROPEAN COMMISSION, 2008), assim as áreas são classificadas em:

Grau A (ISO classe 5) – área de alto risco operacional. Onde é realizado o envase, abertura de ampolas e conexões assépticas. Operação geralmente feita em sistema de fluxo unidirecional.

Grau B (ISO classe 5) – área circundante à área Grau A. Área de preparação e envase asséptico.

Grau C e D (ISO classe 7 e 8) – áreas onde são realizadas etapas menos críticas. Área onde o produto não está diretamente exposto.

A legislação nacional, RDC N° 17/2010, e normas internacionais sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos determinam que o preparo de soluções injetáveis deve ser realizado em área Grau A (ISO classe 5), circundada por áreas de suporte com classificação de ar menos rigorosa e de acordo com a atividade desenvolvida (ANVISA, 2010, EUROPEAN COMMISSION, 2008, FDA, 2004).

Quadro 1 - Comparação entre os diferentes sistemas de classificações de área limpa.

<b>OMS e EEC (GMP)</b>	<b>Estados Unidos (habitual)</b>	<b>ISO 14644-1</b>
<b>Grau A/ Classe A</b>	Classe 100	ISO classe 5
<b>Grau B/ Classe B</b>	Classe 100	ISO classe 5
<b>Grau C/ Classe C</b>	Classe 10.000	ISO classe 7
<b>Grau D/ Classe D</b>	Classe 100.000	ISO classe 8

OMS = Organização Mundial da Saúde; EEC = The European Economic Community; GMP = Good Manufacturing Practices

fonte: adaptado pela autora a partir de FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010).

Quadro 2 - Número máximo de partículas em suspensão no ar permitido para condições “em repouso” e “em operação”.

Grau	Em repouso		Em operação	
	Número máximo de partículas permitido/m <sup>3</sup>		Número máximo de partículas permitido/m <sup>3</sup>	
	> 0,5 µm	> 5 µm	> 0,5 µm	> 5 µm
<b>A</b>	3.520	20*	3.520	20*
<b>B</b>	3.520	29	352.000	2.900
<b>C</b>	352.000	2.900	3.520.000	29.000
<b>D</b>	3.520.000	29.000	Não definido	Não definido

\*A partir de 2015, a ISO 14644-1 não define o valor máximo para partículas acima de 5 µm em ambiente GRAU A.

fonte: EUROPEAN COMMISSION (2008).

Quadro 3 - Número máximo de partículas viáveis permitidas para cada tipo de monitoramento durante o processo de produção.

Tipo de monitoramento	Classificação da área limpa (Grau)	EU GMP; Anvisa (2013); WHO Annex 6	FDA GMP	USP
Amostragem ativa do ar (UFC/m <sup>3</sup> )	A	< 1	1	> 1
	B	10	7	ND
	C	100	10	> 10
	D	200	100	> 100
Amostragem passiva do ar (placa 90 mm) (UFC/4 h)	A	< 1	1	ND
	B	5	3	ND
	C	50	5	ND
	D	100	50	ND
Placas de contato (placa de 55 mm) (UFC/placa)	A	< 1	ND	> 3
	B	5	ND	ND
	C	25	ND	> 5
	D	50	ND	> 100
Teste de contato das luvas (5 dedos) (UFC/luva)	A	< 1	ND	> 3
	B	5	ND	ND
	C	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND

EU GMP = *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice*; Anvisa = Agência Nacional de Vigilância Sanitária; WHO = *World Health Organization*; FDA GMP = *FDA Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice*; USP = *United States Pharmacopeia*; UFC = Unidades formadoras de colônias.

fonte: elaborada pela própria autora ND – valor não definido

### 1.6.2 Parâmetros de um sistema de área limpa

O Grau de limpeza de uma área limpa depende do sistema de filtragem, do número de trocas de ar por hora, da distribuição do ar dentro da área e do diferencial de pressão entre os ambientes com diferentes classificações de partículas (PEYTON; ABDON, 1995).

#### 1.6.2.1 *Sistema de filtragem*

No sistema de filtragem são utilizados os filtros grossos, filtros de baixa eficiência (pré-filtros) e os filtros de alta eficiência (filtros absolutos - HEPA). Os filtros grossos são instalados na UTA e são capazes de reter sujidades a fim de reduzir o número de particulados nos dutos de insuflamento de ar para a área limpa (ANVISA, 2013). Os pré-filtros são dispostos antes dos filtros absolutos com o objetivo de protegê-los contra a rápida saturação, prolongar o tempo de vida e a eficiência do filtro HEPA (ANVISA, 2013, PEYTON; ABDON, 1995). Dispostos em sequência, são capazes de reter até 99,97% de partículas do ar com diâmetro acima de 0,3  $\mu\text{m}$  (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

#### 1.6.2.2 *Número de trocas de ar e distribuição do ar*

A área de trabalho é insuflada com ar filtrado através de um sistema de fluxo unidirecional ou turbulento e qualquer partícula introduzida ou formada é removida rapidamente através da exaustão, garantindo um ambiente com baixo nível de contagem de partículas (ANVISA, 2013, WHYTE, 2003).

O fluxo de ar em áreas limpas com classificação Grau B, C e D (ISO 6, 7 e 8) é não unidirecional e em áreas com classificação Grau A (ISO classe 5), o fluxo é unidirecional podendo ser horizontal ou vertical (WHYTE, 2003).

A velocidade para o fluxo de ar unidirecional deve ser entre 0,36 - 0,54 m/s a fim de forçar o fluxo laminar do ar e evitar a manutenção do ar turbulento formado pela presença de obstáculos na área de trabalho (funcionário, material e equipamentos) e movimentos durante o processo de produção (ANVISA, 2013,

WHYTE, 2003). Essa velocidade do ar através dos filtros promove uma perda de carga (queda de pressão) entre 120-170 Pa. Uma perda superior a 2,5 a 3 vezes o limite esperado requer limpeza ou substituição dos filtros HEPA (WHYTE, 2003). Esse aumento da perda de pressão ocorre pela saturação do filtro por acúmulo de partículas (ANVISA, 2013).

O rigor de uma área quanto ao número de partículas totais está relacionado ao número de trocas de ar. Esse parâmetro indica quanto de ar limpo é necessário ser insuflado em uma área para renovar e expulsar o ar contaminado. Portanto, quanto maior a classificação exigida para a área, maior a taxa de troca de ar necessária (PEYTON; ABDON, 1995, WHYTE, 2003). Uma área limpa para atingir uma classificação específica deve ter uma taxa de troca de ar capaz de remover a quantidade de partículas geradas durante o processo de produção devido às atividades dos funcionários, equipamentos e característica do produto, capaz de neutralizar a carga térmica e manter em equilíbrio o sistema de insuflamento e exaustão a fim de assegurar o diferencial de pressão necessário entre os diferentes ambientes da área limpa (USP, 2016c, ANVISA, 2013, WHYTE, 2003).

A taxa mínima de troca de ar em áreas limpas varia de 20 a 600 trocas de ar por hora, de acordo com o rigor de partículas no ar necessário para o ambiente de produção (PEYTON; ABDON, 1995).

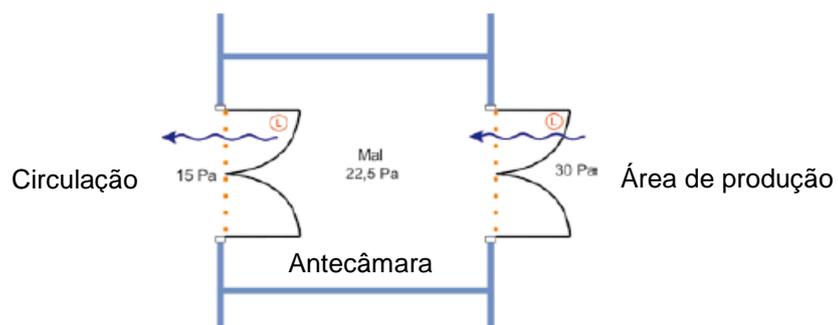
#### 1.6.2.3 *Diferencial de pressão*

O direcionamento do fluxo de ar entre diferentes ambientes de uma área limpa é importante a fim de evitar a transferência de ar contaminado de um ambiente “mais sujo” para um ambiente “mais limpo”. Esse fluxo de ar é obtido pelo diferencial de pressão, que é a diferença entre a vazão de insuflamento de ar filtrado e a vazão de exaustão. A vazão de insuflamento maior que a vazão de exaustão gera um ambiente com pressão positiva e a vazão de exaustão maior que o insuflamento, um ambiente com pressão negativa (ABNT, 2005, PEYTON; ABDON, 1995). Portanto, o diferencial de pressão deve ser estabelecido de acordo com o grau de risco de contaminação para o produto e para o ambiente (ANVISA, 2013, USP, 2016c).

As antecâmaras são barreiras físicas que auxiliam no diferencial de pressão e atuam como câmaras de passagem de pessoal e material entre os diferentes ambientes da área limpa. Há diversas classificações para a antecâmara, mas para o presente trabalho destacamos dois tipos, cascata e bolha, conforme Figuras 1 e 2. O tipo cascata é empregado em processo de produção de estéreis e tem o objetivo de proteger a área de produção considerada ambiente crítico. Nesse caso, o diferencial de pressão deve garantir que o fluxo de ar seja da área de produção de maior pressão, para as áreas adjacentes de menor pressão, a fim de evitar que contaminantes das áreas menos classificadas alcancem o produto no ambiente crítico. A antecâmara tipo bolha é empregada em ambientes de produção de substâncias estéreis e de risco. O diferencial de pressão deve garantir que a pressão da área de produção seja inferior das demais, garantindo que possíveis aerossóis formados durante o processo de produção não sejam capazes de contaminar as áreas adjacentes e ao mesmo tempo impedir que contaminantes de outras áreas com menor classificação alcancem à área de produção (ANVISA, 2013, PEYTON; ABDU, 1995, USP, 2016c).

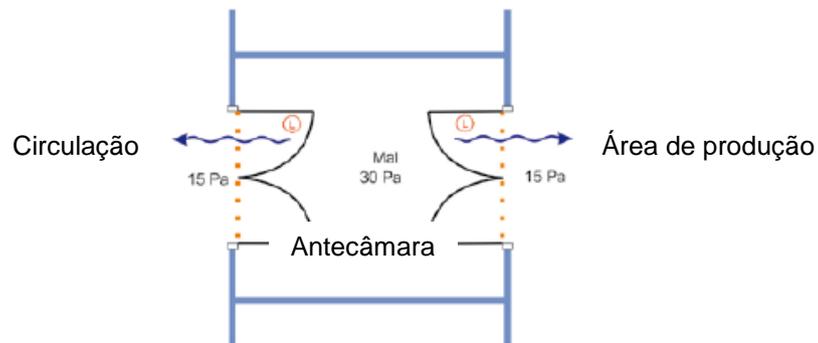
As antecâmaras devem possuir a mesma classificação da área adjacente de maior classificação (WHO, 2012) e a movimentação através delas deve ser lenta a fim de não superar o diferencial de pressão e evitar o contrafluxo indesejável de contaminantes (PEYTON; ABDU, 1995).

Figura1 - Antecâmara tipo cascata



fonte: Adaptado de ANVISA (2013)

Figura 2 - Antecâmara tipo bolha



fonte: Adaptado de ANVISA (2013)

## 1.7 REQUALIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS TOTAIS NO AMBIENTE

O sistema de tratamento de ar em uma área limpa é uma das ferramentas para garantir a qualidade do ambiente de produção. Após a instalação, a área limpa deve passar por ensaios de comissionamento para avaliar se o sistema foi projetado e instalado adequadamente e posteriormente, por ensaios de qualificação e requalificação a fim de verificar o desempenho do sistema HVAC e garantir que o sistema opere dentro dos limites aceitáveis conforme as BPF (ANVISA, 2013).

A qualificação de uma área limpa deve avaliar a qualidade do ar quanto à partícula total no estado de ocupação como construído, em repouso e especialmente em operação (ANVISA, 2013, FDA, 2004). O ensaio no estado em repouso tem o objetivo de conferir se o sistema HVAC apresenta o desempenho esperado, já o ensaio em operação avalia se a condição do ambiente de produção, com todos os materiais, equipamentos e funcionários presentes e em atividade, está dentro do limite aceitável. Porém, a correta determinação da concentração de partículas em um ambiente, depende do funcionamento correto de todos os parâmetros que sustentam a integridade operacional do sistema (WHYTE, 2003). A ISO 14644 parte 2 de 2000 especifica os ensaios e a frequência mínima para sua realização a fim de verificar se o sistema funciona corretamente de modo a garantir que a área limpa se mantenha dentro dos padrões de qualidade, como mostrados nos Quadros 4 e 5. Além disso, estabelece a realização dos ensaios após a interrupção significativa da

circulação de ar, alteração na especificação de um parâmetro do sistema e manutenções que alterem o estado operacional da área limpa. O resultado de um ensaio fora do especificado, requer ação imediata para contornar o problema e em seguida, ensaios de requalificação devem ser realizados a fim de assegurar que não só o parâmetro avaliado esteja adequado, mas bem como todo o sistema de filtragem (ISO, 2000).

O Monitoramento ambiental de partículas totais é a realização de ensaios durante o processo de produção e em repouso. Visa acompanhar a qualidade do ambiente de forma contínua principalmente durante as fases críticas do processo produtivo, permitindo identificar os momentos de risco de contaminação, possibilitando ações para correção e prevenção da contaminação do produto. Os resultados do monitoramento contínuo permitem criar ferramentas como gráficos de tendência histórica, estabelecer limites de alerta e ação para os parâmetros que se quer acompanhar e estabelecer as ações corretivas e preventivas. Logo, o monitoramento avalia não só o desempenho do sistema HVAC, mas também a estrutura física da área, procedimentos de paramentação e limpeza dos funcionários, funcionamento dos equipamentos e seguimento criterioso dos processos (ANVISA, 2013, ISO, 2015b, WHYTE, 2003). Alguns guias e normas - *European Commission* (2008), WHO (2011), *Guidance...* (2012) e Anvisa (2013) - exigem monitoramento contínuo nos ambientes Grau A e, em áreas com classificação menos rigorosa a frequência do monitoramento pode ser reduzida por não oferecerem risco direto ao produto. Nos casos de risco de contaminação do produto, pela amostragem pode ser feita a simulação do processo de produção desde que justificado (EUROPEAN COMMISSION, 2008, WHO, 2012). Os principais parâmetros avaliados continuamente no monitoramento ambiental são contagem de partícula total, diferencial de pressão entre as áreas (ANVISA, 2010, WYTE, 2003) temperatura e umidade relativa (FDA, 2004, GUIDANCE..., 2012).

Além do plano de monitoramento dos parâmetros do sistema de filtragem, é fundamental que componentes essenciais e coadjuvantes do sistema de tratamento de ar sejam incluídos em um Plano de Manutenção, Operação e Controle (PMOC) (BRASIL, 1998). Esse plano deve descrever as atividades a serem desenvolvidas nos casos de falha do equipamento e periodicidades de manutenção e limpeza a fim de garantir a qualidade do ar. A resolução Nº 9, de 16 de janeiro de 2003 estabelece a frequência de manutenção de alguns desses componentes (Quadro 6).

Quadro 4 - Especificação dos principais ensaios para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.

Ensaio	Objetivo
<b>Contagem de Partículas</b>	Especificar a concentração de partículas de diâmetro 0,5 µm e 5 µm.
<b>Volume de ar (nº de trocas de ar)</b>	Verificar o volume de ar insuflado por unidade de tempo. Realizado em áreas limpas de fluxo de ar não unidirecional.
<b>Velocidade e uniformidade do fluxo de ar</b>	Verificar a velocidade e a uniformidade do fluxo de ar. Realizado em áreas limpas de fluxo de ar unidirecional.
<b>Diferencial de pressão</b>	Verificar a capacidade da instalação em manter as diferenças de pressão especificadas entre as instalações e seus arredores.
<b>Vazamento do filtro instalado</b>	Verificar se o sistema de filtragem final com filtro absoluto está instalado corretamente. Verificar se há furos e danos no meio filtrante, selante, moldura do filtro, vedação, quadros de fixação e estrutura de sustentação.
<b>Ensaio e visualização do sentido do fluxo de ar</b>	Verificar se o sentido do fluxo de ar e sua uniformidade estão em conformidade com o projeto e as especificações de desempenho.
<b>Recuperação</b>	Determinar se a instalação é capaz de retornar a uma classificação de ar, dentro de um tempo estabelecido, após exposição a uma geração de partículas em suspensão no ar, como desafio.
<b>Integridade da contenção</b>	Determinar se há penetração na área limpa de ar não filtrado proveniente de áreas adjacentes não controladas através das juntas, passagem de portas e forros pressurizados.
<b>Temperatura e Umidade</b>	Demonstrar a capacidade do sistema de tratamento de ar da instalação em manter os níveis de temperatura e de umidade do ar dentro dos limites de controle.

fonte: adaptada pela autora a partir da ISO (2000) e ABNT (2009).

Quadro 5 - Frequência e estado de ocupação para a realização dos principais ensaios para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.

Ensaio	Classificação da área	Intervalo máximo sugerido (ISO 14644-2)	Estado de ocupação da área
<b>Contagem de partículas</b>	≤ ISO classe 5	6 meses *	Repouso, construído e em operação
	> ISO classe 5	12 meses *	
<b>Volume de ar (nº de trocas de ar)</b>	> ISO classe 5	12 meses*	Repouso, construído e em operação
<b>Velocidade e uniformidade do fluxo de ar</b>	ISO classe 5	12 meses*	Repouso, construído e em operação
<b>Diferencial de pressão</b>	Todas as classes	12 meses*	Repouso, construído e em operação
<b>Vazamento do filtro instalado</b>	Todas as classes	24 meses**	Repouso e construído
<b>Ensaio e visualização do sentido do fluxo de ar</b>	Todas as classes	24 meses*	Repouso e construído
<b>Recuperação</b>	Não recomendado para fluxo unidirecional e ISO classe 8 e 9.	24 meses*	Repouso e construído
<b>Integridade da contenção</b>	≥ ISO classe 6	24 meses*	Repouso e construído
<b>Temperatura e Umidade</b>	Todas as classes	Não especificado	Repouso, construído e em operação

\*Os ensaios devem ser realizados no intervalo sugerido ou após ações corretivas e interrupção do fluxo de ar. \*\* Os ensaios devem ser realizados no intervalo sugerido, após ações corretivas, interrupção do fluxo de ar e após troca dos filtros finais.

fonte: adaptada pela autora a partir da ISO (2000) e ABNT (2009).

Quadro 6: Periodicidade mínima para limpeza e manutenção dos componentes do sistema .Heating, Ventilation, Air Conditioning (HVAC)

Componentes do sistema	Periodicidade
Tomada de ar externo e unidades filtrantes (filtros grossos)	Limpeza mensal ou descarte em no máximo três meses
Bandeja de condensação	Limpeza mensal ou o recomendado pelo fabricante
Umificador e serpentinas de aquecimento e resfriamento	Desencrustação semestral e limpeza trimestral
Ventilador	Limpeza semestral
Plenum de mistura/ casa de máquinas	Limpeza mensal

fonte: ANVISA (2003).

### 1.7.1 Plano de monitoramento de partículas não viáveis

O monitoramento de partículas não viáveis deve estar descrito em um programa com definição e justificativa dos locais, volume e frequência de amostragem (ANVISA, 2013, ISO, 2015b). Deve haver um desenho esquemático da área limpa com os locais de amostragens definidos e as justificativas das escolhas documentadas (ANVISA, 2013).

#### *1.7.1.1 Contagem de partículas*

A amostragem de ar para contagem das partículas totais é realizada com um Contador de Partículas Discretas (CPD) com capacidade de registrar a concentração e o diâmetro das partículas suspensas no ar. Em áreas com equipamento de fluxo de ar unidirecional, a abertura da sonda do CPD deve ser posicionada no sentido do fluxo de ar e, em áreas com fluxo de ar não unidirecional a sonda deve ser posicionada na vertical (ABNT, 2009).

A primeira versão da ISO 14644 parte-1 de 1999 definia o número de pontos de amostragens baseado na “raiz quadrada da área limpa”, porém, a atualização da norma publicada em 2015, não utiliza esse conceito e fixa em uma tabela o número de pontos para amostragem. Na versão mais recente da ISO, áreas com mais de 6 m<sup>2</sup> passam a ter um número maior de pontos de amostragem quando comparado à versão anterior a fim de aumentar o poder estatístico do ensaio. Além disso, foi retirado o limite máximo para partículas acima de 5 µm em ambientes Grau A (ISO Classe 5) devido a dificuldade em se medir baixas concentrações de partículas desse diâmetro nesses ambientes (SBCC, 2016).

A definição da localização dos pontos para amostragem deve ser baseada em uma análise de risco e representativa de toda a área. A posição para amostragem deve ser na altura do trabalho e a uma distância de 30 cm das atividades operacionais (ANVISA, 2013, WHO, 2012).

A avaliação do desempenho do sistema HVAC deve ser feita através dos ensaios em repouso e em operação. O ensaio em repouso deve ser realizado ao

término das atividades e sem os funcionários presentes. Permite verificar se o sistema é capaz de se restabelecer em um curto período de tempo e atingir os parâmetros de uma área em estado de repouso após a conclusão do processo de produção (ANVISA, 2010, WHYTE, 2003). O ensaio em operação é considerado o mais importante por demonstrar se a classificação da área para um determinado processo, com os equipamentos ligados e fluxo de materiais e funcionários, é mantida durante as atividades de produção (EUROPEAN COMMISSION, 2008, WHYTE, 2003). A concentração de partículas esperada nos ensaios durante as atividades deve ser maior que a encontrada nos ensaios da área em estado de repouso, devido ao número de funcionários presentes, a taxa de fluxo de ar, eficiência da ventilação, funcionamento dos equipamentos e atividades nas áreas adjacentes (FAVERO et al, 1966, ISO, 2015b).

Para o monitoramento de partículas totais, a frequência de amostragem para processos considerados críticos e realizados em ambientes Grau A deve ser realizado durante todo o tempo de produção (EUROPEAN COMMISSION, 2008, ANVISA, 2013, GUIDANCE..., 2012, WHYTE, 2003). Para esse tipo de monitoramento não é necessário e nem é possível estabelecer o número de pontos para amostragem conforme a ISO 14644-1. O número de pontos de amostragem pode ser reduzido e distribuído na área crítica (WHYTE, 2003). O Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica publicado pela Anvisa estabelece a frequência de amostragem para o monitoramento ambiental de partículas totais em diferentes classificações de ambiente (Quadro 7).

É fundamental estabelecer os limites de alerta e ação para contagem de partículas totais a fim de comprovar que o nível de limpeza do ar está sob controle principalmente nos pontos considerados críticos para o processo. Para efeito de comparação com a tendência histórica, os pontos previamente definidos para a amostragem não devem ser modificados (ISO, 2015b).

Quadro 7 - Frequência de amostragem de partículas totais no monitoramento ambiental.

<b>Classificação da área limpa</b>	<b>Amostragem no monitoramento ambiental de partículas totais (em operação)</b>
<b>Grau A</b>	Durante toda produção
<b>Grau B</b>	Nos dias de produção
<b>Grau C</b>	Semanalmente
<b>Grau D</b>	Não exigido
<b>EFU em área Grau B</b>	Nos dias de produção
<b>EFU em área Grau C</b>	Semanalmente
<b>EFU em área Grau D</b>	Mensalmente
<b>EFU em áreas não classificadas</b>	Requalificação periódica

EFU – Equipamento de Fluxo Unidirecional  
 fonte: adaptada pela autora a partir da ANVISA (2013).

#### 1.7.1.2 Diferencial de pressão

O diferencial de pressão entre áreas de diferentes classificações de ar também é um parâmetro importante a ser avaliado de forma contínua durante o processo de produção (FDA, 2004, GUIDANCE..., 2012). Esse monitoramento pode ser feito através de indicadores de diferencial de pressão instalados entre as áreas e acompanhados e registrados de forma regular pelos funcionários do processo de produção, devendo ser feito uma vez por turno ou no mínimo uma vez por dia (USP, 2016c, FDA, 2004) ou por instrumentos automáticos (ISO, 2015b). Outros sistemas de alarme podem ser adotados para verificar a abertura simultânea das portas das antecâmaras e falhas no sistema de ventilação (ANVISA, 2010).

Em áreas com classificação de ar menor rigorosa (Grau C e D) o intervalo do monitoramento pode ser maior, e sem prejuízo para o processo (ANVISA, 2013, EUROPEAN COMMISSION, 2008).

Não há um valor específico para o diferencial de pressão entre duas áreas, mas é aceitável uma variação de 5-20 Pascal (Pa) (ANVISA, 2013). Além disso,

esse parâmetro é capaz de fornecer informação, indireta, do fluxo de ar dentro da área limpa (WHYTE, 2003).

### *1.7.1.3 Temperatura e Umidade relativa*

A definição da temperatura e umidade para uma área limpa deve estar atrelada à característica do produto produzido e às atividades ali desempenhadas. O controle regular ou contínuo da temperatura e, principalmente, da umidade é crucial para inibir a proliferação microbológica no ambiente de produção e garantir ambiente confortável aos funcionários. A temperatura de conforto deve considerar o tipo de roupa utilizada para as atividades realizadas na área limpa a fim de minimizar a liberação de partículas pelos funcionários (WHO, 2011).

A temperatura recomendada pela Norma ABNT NBR 7256 para a área de manipulação de quimioterápicos e nutrição parenteral deve estar entre 21-24 °C e a umidade relativa entre 40-60% (ABNT, 2005).

Mesmo com o funcionamento correto do sistema de tratamento de ar, o processo pode ser comprometido por práticas inadequadas dos funcionários envolvidos no processo de produção e manutenção (FDA, 2004). Portanto, para alcançar os limites sugeridos é necessária a realização de testes para garantir a integridade das condições físicas e microbológicas da área limpa com controle rigoroso e acompanhamento contínuo de todos os ensaios do ambiente, da infraestrutura, dos equipamentos, da água e dos funcionários (FARMACOPEIA..., 2010, WU; LIU, 2007), a fim de garantir produtos farmacêuticos estéreis de alta qualidade.

## 1.8 MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NO AMBIENTE

O monitoramento microbológico em uma área limpa é uma ferramenta utilizada para demonstrar que o processo de produção asséptico está inserido em um ambiente de alta qualidade e dentro dos limites aceitáveis sugeridos pelos guias

e normas de BPF. Permite identificar as mudanças no cenário da microbiota do ambiente demonstrando alterações ou falhas no processo de produção (FDA, 2004, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O estabelecimento de limite de alerta e ação em um programa de monitoramento ambiental permite acompanhar e detectar a deterioração prévia do processo ambiental, possibilitando a implementação de ações preventivas e corretivas antes da contaminação do produto ocorrer (ANVISA, 2013, HALLS, 2003). Esses limites podem ser estabelecidos a partir de experiências anteriores e analogia de processos ou a partir dos resultados históricos obtidos do monitoramento ambiental realizado como rotina por um determinado período de tempo (FARMACOPEIA..., 2010). O estabelecimento desses limites deve ser dinâmico e atualizado de acordo com os resultados do monitoramento, seja pela inserção de novas tecnologias ou pelo maior rigor nos processos e condutas (PDA, 2014).

O limite de alerta, quando excedido, não indica contaminação do produto, mas sim desvio do processo, sendo necessário acompanhar e revisar os documentos de manutenção, limpeza e desinfecção da área, registro de parâmetros físicos e conduta dos funcionários (FARMACOPEIA..., 2010, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, USP, 2016b). O limite de ação indica a ruptura no processo de produção e risco à segurança e à qualidade do produto, sendo necessária a ação imediata e investigação. As ações adotadas vão desde a revalidação dos processos padronizados, revisão da técnica e frequência de amostragem, retreinamento dos funcionários até a identificação quanto ao gênero e espécie dos micro-organismos detectados na amostragem e sua correlação com a fonte de contaminação (FARMACOPEIA..., 2010, PDA, 2014, USP 2016b). No monitoramento ambiental, exceder frequentemente o limite de ação pode indicar rigor no estabelecimento desse limite ou que a infraestrutura da área limpa e o processo de produção não estão adequados para a produção de estéreis (HALLS, 2003).

Embora diversas fontes de referência mencionem a importância de se estabelecer limites de alerta e ação – Farmacopeias e Guias de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos dos Estados Unidos, da Europa e do Japão – a Farmacopeia Americana destaca a baixa significância em relação ao número de colônias entre o limite de alerta e o limite de ação, principalmente em ambiente com alto rigor de classificação de ar, pois nessas áreas o nível de micro-organismos

esperado tende a ser reduzido. Porém, mesmo que a significância seja reduzida, a determinação dos limites de alerta e ação permite acompanhar a evolução do ambiente de produção e estabelecer condutas a serem realizadas na investigação e resolução até o restabelecimento do controle.

O conhecimento qualitativo da microbiota quanto ao gênero e/ou espécie em uma área limpa é uma ferramenta importante, pois permite criar um banco de dados com os micro-organismos encontrados na área limpa e avaliar as tendências de ocorrência e mudanças dos principais grupos da microbiota e níveis e tipos de micro-organismos presentes no monitoramento realizado como rotina (PDA, 2014, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, USP, 2016b).

Embora a caracterização e a identificação da microbiota presente na área não sejam obrigatórias, e sim uma orientação, principalmente quando os limites de ação são excedidos, recomenda-se que a identificação faça parte do programa de monitoramento, pois essas informações permitem conhecer as características dos micro-organismos quanto à capacidade de resistência e patogenicidade, identificar as possíveis fontes de contaminação e correlacionar com práticas de limpeza, desinfecção e higiene dos funcionários, permitindo o planejamento de ações efetivas (PACHECO; PINTO, 2010, USP, 2016b). Pode ser estabelecido um esquema de caracterização e identificação dos micro-organismos a partir da classificação da área e o limite (alerta ou ação) atingido no monitoramento. Em ambientes menos rigorosos, Grau C e D, pode ser realizada a caracterização microbiana quando atingido o limite de alerta e a identificação quando atingido o limite de ação, e em ambientes críticos, Grau A e B, deve ser realizada a identificação dos micro-organismos, independente do limite atingido (PDA, 2014).

A identificação dos micro-organismos deve estar atrelada à classificação da área, a atividade desempenhada e ao item amostrado (vestimenta, mão do funcionário, água, ar e superfície), para que possíveis migrações de micro-organismos possam ser identificadas a fim de se estabelecer uma relação causal (FDA, 2004, SANDLE, 2011).

Estudos mostram que os micro-organismos mais encontrados em áreas limpas industriais de diferentes partes do mundo são as bactérias Gram-positivas. Dentre estas, os gêneros mais isolados em áreas limpas são *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e os formadores de endósporos do gênero *Bacillus* spp. (FAVERO et al, 1966, HALLS, 2003, PACHECO; PINTO, 2010, PARK et al 2013,

SANDLE, 2011, WU; LIU, 2007). Em menor número estão as bactérias Gram-negativas e, em seguida, os fungos. A presença de bactérias Gram-negativas está relacionada a áreas com presença de água, umidade, deficiência na limpeza e desinfecção (PACHECO; PINTO, 2010, SANDLE, 2011) e higiene pessoal dos funcionários, sendo geralmente mais comum em áreas com menor Grau de classificação de ambiente, em que o controle de partículas não é tão rigoroso. Por isso, nesses ambientes, é esperado e aceitável uma maior diversidade da microbiota (SANDLE, 2011). A diferença de uma área limpa com maior Grau de classificação de ambiente de uma com menor classificação, não é apenas o número de colônias formadas, mas sim, os tipos de micro-organismos identificados nessas áreas (FAVERO et al, 1966).

O método convencional, ainda muito empregado, para o monitoramento ambiental descrito nas Farmacopeias (Americana, Brasileira, Europeia e Japonesa), assim como na legislação nacional (RDC Nº 17/2010) e normas internacionais (FDA GMP e EU GMP) são baseados na recuperação de micro-organismos em meios de cultura após um período de incubação. Esses métodos, por limitação da própria técnica, não são capazes de quantificar todos os micro-organismos presentes no ambiente (USP, 2016b). Além disso, há os micro-organismos viáveis, mas não cultiváveis (*viable but non-culturable* – VBNC), que entram em estado de latência em resposta a condição de estresse que são submetidos, não sendo, recuperados nos meios de cultura e temperatura de incubação usualmente empregada no monitoramento ambiental (OLIVER, 2014).

### 1.8.1 Plano de monitoramento microbiológico

A fim de se avaliar o estado de controle ambiental quanto à contaminação microbiana durante o processo de produção de soluções injetáveis, é necessário um plano de monitoramento detalhado para cada área da produção. Esse plano deve definir materiais a serem monitorados, locais e métodos de amostragem, meios de cultura empregados, frequência e momento da amostragem, estabelecimento de níveis de alerta e ação, condutas no caso do nível de alerta e ação excederem e as fases da investigação quando for identificada contaminação pontual ou sequencial

(JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, PDA, 2014, SHINTANI, 2015b). Para que o plano de monitoramento seja eficiente, é fundamental que os meios de cultura sejam validados quanto à fertilidade e a esterilidade, os equipamentos calibrados, sistema de filtragem qualificado, funcionário responsável pelo monitoramento ambiental treinado e capacitado para a função e que os processos operacionais estejam descritos (PDA, 2014).

O monitoramento deve ser realizado durante os turnos de produção e repouso e deve contemplar a amostragem do ar, chão, parede, superfícies, equipamentos, mãos e vestuários dos funcionários (JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, SHINTANI, 2015b).

#### 1.8.1.1 *Amostragem do ar*

A avaliação da contaminação do ar por partículas viáveis em uma sala limpa geralmente é feita por dois métodos básicos de amostragem: ativa e passiva (ANDON, 2006, FDA, 2004).

##### 1.8.1.1.1 *Amostragem Ativa do ar*

A amostragem ativa do ar é um método quantitativo baseado na captação de um volume estabelecido de ar com partículas de diversos diâmetros e sua impactação em um meio de cultura para pesquisa de bactérias e fungos (ANDON, 2006). Há diversos métodos descritos, porém os mais utilizados são por impactação e centrifugação (USP, 2016b, FARMACOPEIA..., 2010).

Para esse tipo de amostragem não há um equipamento padrão estabelecido (ANVISA, 2013, WHO, 2012) e, comercialmente, há uma grande variedade de equipamentos disponíveis. Porém a escolha e a adequação do uso são de responsabilidade do usuário (ANVISA, 2013, WHO, 2012, FARMACOPEIA..., 2010), assim como sua calibração e a utilização de acordo com os procedimentos do fabricante (FDA, 2004).

Os equipamentos devem ser utilizados com cautela na amostragem durante o processo de produção em área crítica (Grau A), pois podem promover turbulência e quebra do fluxo unidirecional do ar, aumentando a probabilidade de contaminação do produto (FARMACOPEIA..., 2010, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011). A velocidade de captação do ar deve favorecer a captura de micro-organismos, mesmo em baixos níveis, sem causar desidratação do meio de cultura, decorrente da força de sucção de grande volume do ar, e dano aos micro-organismos, devido a velocidade de impactação do ar no meio de cultura (ANVISA, 2013, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, STEWART et al, 1995).

Outra desvantagem do método é a limitação do volume de ar amostrado, que pode não ser representativa do ambiente de produção e não ser capaz de detectar eventuais contaminações que possam ocorrer durante o processo de produção (ANVISA, 2013, PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000).

O volume de ar a ser coletado sugerido por normas nacionais e internacionais para cada medição é de no mínimo 1 m<sup>3</sup> (1.000 litros) e o resultado deve ser dado em UFC/m<sup>3</sup> (ANVISA, 2010, EUROPEAN COMMISSION, 2008).

#### 1.8.1.1.2 *Amostragem passiva do ar*

O método por sedimentação se baseia em placas de Petri de diâmetro específico (geralmente 90 mm), com meio de cultura para pesquisa de bactérias e fungos, expostas por um determinado período de tempo (JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015;). O resultado é expresso em número de UFC por placa exposta por tempo (horas) (ANDON, 2006).

É um método que depende da gravidade, do fluxo de ar, do tamanho da placa de Petri e do diâmetro da partícula para sedimentação (ANDON B, 2006, ANVISA, 2013, PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000). Portanto, quanto mais turbulento o ar da área, maior o tempo em que as partículas ficam suspensas e menor a deposição nas placas de cultura (SANDLE, 2015).

Embora seja um método simples e de baixo custo (FARMACOPEIA..., 2010), o seu uso isolado no monitoramento ambiental não é recomendado devido a limitação do método em detectar apenas os micro-organismos suspensos no ar

capazes de se depositarem na superfície (FDA, 2004, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011). Além disso, não é possível estabelecer um volume de ar amostrado (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000), sendo considerado um método qualitativo ou semi-quantitativo (FDA, 2004). Um resultado negativo nesse tipo de amostragem não indica ausência de contaminação no ar e sim ausência de detecção da deposição dos micro-organismos na placa (ANDON, 2006, FDA, 2004, ISO, 2003, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011).

Em um ambiente Grau A, onde há maior rigor no número total de partículas por m<sup>3</sup> de ar e a troca de ar é intensa, as partículas de menor diâmetro tendem a seguir o fluxo unidirecional do ar e não se depositarem sobre as placas de Petri. Isso reduz a eficiência do método (ANDON B, 2006, HALLS, 2003, SANDLE, 2015), contudo, permite o monitoramento contínuo, e a possibilidade de conhecer os níveis de biocontaminação do ambiente durante todo o processo de produção (ANVISA, 2010, PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000).

A desidratação do meio de cultura decorrente da exposição prolongada das placas em uma área com alto fluxo de ar, como em áreas limpas, pode prejudicar a recuperação dos micro-organismos depositados e indicar um resultado falso da condição microbiológica do ambiente (ANDON B, 2006, FDA, 2004). A fim de solucionar esse problema, um estudo de validação deve ser conduzido e considerar a velocidade do fluxo de ar da área, a composição do meio de cultura, o tempo máximo de exposição das placas, o tempo de incubação e os tipos de micro-organismo testados. Como resultado satisfatório, o estudo deve apresentar recuperação de mais de 70% dos micro-organismos testados (ANVISA, 2013, SANDLE, 2015). A partir desse estudo, um número maior de intervenção humana para substituição das placas durante o monitoramento pode ser necessário e deve ser avaliado, de forma cautelosa, a fim de evitar riscos de contaminação durante o processo de produção (ANDON B, 2006).

#### 1.8.1.2 *Amostragem da superfície*

A amostragem da superfície é necessária para determinar e controlar o nível de biocontaminação nas superfícies em todos os níveis de classificação de ambiente da área limpa (ISO, 2003, USP 2016c).

O método permite avaliar as práticas de higiene e limpeza dos equipamentos, utensílios e estrutura física da área limpa, bem como a competência dos funcionários no cumprimento rigoroso das condutas e práticas de trabalho a fim de evitar a transferência de contaminantes de um local para o outro (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, USP, 2016c, WHYTE, 2002).

A definição dos pontos e os itens a serem monitorados devem estar descritos em um plano de monitoramento ambiental, baseados na classificação da área, nos processos ali realizados e nos riscos de contaminação direta e indireta do produto (ANVISA, 2013, PDA, 2014, USP, 2016c). Os locais e materiais que não oferecem risco direto de contaminação ao produto podem ser amostrados de forma aleatória (ANVISA, 2013, WHO, 2012).

Os dois métodos geralmente empregados para análise da superfície são placas de contato e *swabs* (FARMACOPEIA..., 2010). A amostragem por placas de contato é realizada em superfície lisa e seca, através do uso de placas RODAC® (*Replicated Organisms Detection and Counting*), geralmente com diâmetro de 50 mm. Na amostragem, deve-se tocar gentilmente o meio de cultura da placa na superfície por no mínimo dez segundos com pressão constante e uniforme e sem movimento circular ou linear (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O método por *swab* é empregado em superfícies irregulares ou de difícil acesso, em que o uso das placas de contato é inviável (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, USP, 2016c). Nessa técnica, os *swabs* devem ser umedecidos com um diluente estéril e friccionados sobre a superfície seca em movimentos paralelos, de forma lenta e com rotação, de forma que toda a superfície do *swab* tenha contato com a superfície em análise (ISO, 2003, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). A superfície amostrada com *swab* deve ser equivalente a uma superfície amostrada por placa de contato (24-30 cm<sup>2</sup>) (USP, 2016c).

Após a amostragem, os *swabs* podem ser colocados em diluentes apropriados e agitados (ISO, 2003) para posterior contagem através de plaqueamento em profundidade ou filtração em membrana. Os *swabs* podem também ser transferidos diretamente para uma placa com meio de cultura e

semeados através de movimentos lentos e paralelos, de forma que toda superfície do *swab* entre em contato com o meio de cultura (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Em ambiente Grau A é recomendado que o monitoramento da superfície seja feito no final do processo de manipulação (ANVISA, 2013, USP, 2016b), a fim de evitar que os resíduos do meio de cultura e a própria intervenção humana, inerente ao processo, contaminem o ambiente e causem ruptura do fluxo de ar na área de produção (USP, 2016b).

A superfície não pode ser higienizada antes da amostragem e deve estar seca no momento da amostragem (ANVISA, 2013). Ao término de cada amostragem, a superfície deve ser imediatamente limpa e desinfetada com um agente desinfetante padronizado e validado (USP, 2016c), através de procedimentos estabelecidos a fim de remover resíduos do meio de cultura da superfície provenientes da amostragem (ISO, 2003, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011;).

A amostragem de superfície é um processo importante na fase de comissionamento de uma nova área limpa e também na fase de validação e revalidação de áreas após um longo período de não produtividade. Para a autorização de funcionamento é necessária a realização de três amostragens consecutivas, seguidas de limpeza e desinfecção. Se o resultado das duas amostragens iniciais for satisfatório, a área pode ser liberada para o início da produção, caso contrário, uma quarta amostragem deve ser realizada. Se o resultado da terceira amostragem for satisfatório, a área pode ser liberada para produção (HALLS, 2003).

O processo de monitoramento de superfície depende do fator humano, logo a contaminação proveniente do processo de amostragem pode ocorrer. Portanto, um resultado satisfatório ou insatisfatório de uma superfície amostrada não deve ser critério isolado de liberação ou reprovação de um produto (USP, 2016b).

O meio de cultura utilizado é um meio inespecífico e pode ser acrescido de agente neutralizante a fim de neutralizar o agente desinfetante utilizado na limpeza da área limpa e materiais evitando resultados falsos negativos (USP, 2016c).

Os resultados são fornecidos em UFC por área (USP, 2016c) e UFC por *swab* (FARMACOPEIA..., 2010).

#### 1.8.1.3 *Análise dos funcionários*

A análise das mãos e vestimentas dos funcionários envolvidos no processo de produção segue os mesmos princípios do monitoramento de superfície. Esse tipo de análise torna-se imprescindível em um plano de monitoramento ambiental, pois uma das principais fontes de introdução e transferência de micro-organismos em preparações estéreis é através do contato pelas mãos dos funcionários, logo a amostragem da luva do manipulador permite detectar a biocontaminação na imediação da área de trabalho. O objetivo do monitoramento é avaliar a capacidade dos funcionários na técnica de colocação das luvas, paramentação e condutas assépticas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, USP, 2016c).

Para a amostragem da luva, é necessário fazer uma leve pressão do polegar e das quatro pontas dos dedos de uma mão em um meio de cultura, por ao menos dez segundos, de forma que não haja quebra do meio (USP, 2016c, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015), repetindo o mesmo procedimento para a outra mão. Antes do procedimento, as luvas não devem ser trocadas ou desinfetadas com agente desinfetante para não gerar um resultado falso negativo (USP, 2016c). Após a amostragem das mãos com luvas, estas devem ser imediatamente descartadas e trocadas (HALLS, 2003) ou uma nova antissepsia das mãos, realizada. O resultado é dado em número de UFC por mão, porém, para estabelecer nível de alerta e ação, deve-se considerar o número total de UFC das duas mãos (USP, 2016c). Esse tipo de monitoramento pode ser realizado nas diferentes fases da produção (início, durante e/ou ao término das atividades). A definição da fase do monitoramento deve estar de acordo com o objetivo da análise proposta (avaliar a técnica de calçar as luvas, avaliar a técnica asséptica durante as atividades e/ou avaliar a luva após o processo de produção) e deve considerar os riscos de contaminação do ambiente e do produto em cada momento da amostragem (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A Farmacopeia Americana sugere que o funcionário, antes de iniciar o trabalho em área de produção de produtos estéreis, seja avaliado por, no mínimo, três vezes na técnica de calçar as luvas. Após a antissepsia da mão, deve ser feita a amostragem das duas mãos com luvas, uma luva em cada placa. O resultado deve ser nenhuma UFC para que o funcionário seja considerado apto a iniciar o trabalho. Essa reavaliação deve ser feita no mínimo anualmente (USP, 2016c).

Outro parâmetro que pode ser avaliado é a carga de biocontaminação do vestuário utilizado dentro da área limpa durante o processo de produção (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). A proximidade do funcionário com o produto manipulado

infiere na possibilidade do vestuário ser uma fonte de contaminação. A amostragem pode ser realizada de forma frequente a fim de avaliar práticas de trabalho ou pode ser realizada aleatoriamente, em processos de validação e revalidação do processo de paramentação asséptica (ANVISA, 2013). Os pontos geralmente amostrados são antebraço e tórax, por serem os locais de maior proximidade, e conseqüentemente, risco para o produto (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Pontos próximos à axila são importantes devido à pressão dessa região no tecido da roupa durante os movimentos e também devido à transpiração (HALLS, 2003), porém outros pontos podem ser utilizados como zíper, braços, parte posterior da cabeça e cordões das botas (HALLS, 2003, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Vestuário com alto índice de contaminação pode ser causado pela baixa qualidade têxtil para retenção de partículas, uso incorreto, pouca troca pelos funcionários, descontaminação insuficiente e contaminação após a lavagem e a desinfecção do vestuário (ISO, 2003).

O momento da amostragem desse tipo de procedimento deve ser realizado no final do processo de produção, a fim de evitar a impregnação do vestuário com meio de cultura, além da impossibilidade de desinfecção e secagem do vestuário durante o processo de produção (HALLS, 2003, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

#### 1.8.1.4 Meios de cultura e período de incubação

Em um programa de monitoramento ambiental os meios de cultura, tempo e temperatura de incubação devem ser definidos a fim de favorecer a identificação da microbiota existente na área limpa (SANDLE, 2014a) e validados previamente quanto à fertilidade e à capacidade de recuperação de mais de 50% de cada espécie de micro-organismo utilizada na validação (ANVISA, 2013). A definição e a validação dos parâmetros de incubação são fundamentais para permitir a comparação dos resultados obtidos ao longo de um determinado período de tempo do monitoramento ambiental (SANDLE, 2014a).

Os meios de cultura sugeridos e geralmente empregados para o monitoramento ambiental em áreas limpas são ágar triptona soja (TSA), para pesquisa da maioria das bactérias aeróbias, e Sabourand dextrose (SBD), para

fungos e leveduras, porém, outros meios equivalentes podem ser utilizados. Para pesquisa de bactérias anaeróbias ou outros micro-organismos não comumente encontrados em áreas de produção de injetáveis, meios de cultura e período de incubação específicos devem ser empregados (FARMACOPEIA..., 2010, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, USP, 2016b). As condições de incubação sugeridas para a identificação de bactérias aeróbias são temperatura de 30-35°C por um período de 2 a 3 dias, e incubação em 20-25°C por 5 a 7 dias para identificação de fungos (FDA, 2004; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; USP 2016c).

Pode ser empregado um único meio de cultura não seletivo, geralmente TSA, com alternância do tempo e da temperatura de incubação a fim de favorecer a identificação de bactérias aeróbias e fungos (FARMACOPEIA..., 2010, SANDLE, 2014a, USP, 2016b), contudo, não há um consenso da ordem de incubação ao se utilizar esses meios. A incubação inicial dos meios de cultura a 20-25°C favorece o crescimento de fungos, o que pode dificultar a identificação e a contagem de colônias de bactérias. A incubação inicial do meio a 30-35°C favorece o crescimento de bactérias, porém, a alta temperatura pode inativar as enzimas do fungo e impedir a sua recuperação favorecendo um resultado falso negativo. Portanto, a escolha da ordem de incubação a ser empregado no monitoramento deve privilegiar a recuperação dos micro-organismos mais prevalentes em cada ambiente da área limpa (SANDLE, 2014a).

Em áreas GRAU A, como a incidência de fungo esperada é baixa, admite-se o uso do meio não seletivo com dois esquemas de incubação. A vantagem no uso do meio não seletivo se deve a menor intervenção humana durante o processo de produção devido a utilização de um número reduzido de placas, menor contaminação do ambiente com resíduo do meio de cultura, além, da redução de custos (GORDON; BERCHTOLD; STAERK, 2014, SANDLE, 2014a).

Em área limpas, quando não se conhece a microbiota presente ou há um crescimento significativo de fungos é preferível utilizar meios seletivos ao invés de meios não seletivos no monitoramento. Em ambientes bem controlados e com conhecimento da microbiota é possível definir o uso do meio não seletivo e a ordem de incubação que favoreça a identificação do micro-organismo prevalente naquele ambiente. É possível também associar, de acordo com a microbiota, os diferentes regimes de incubação (meio seletivo e não seletivo) para o monitoramento do ar,

superfícies e pessoal para cada ambiente da área limpa (GORDON; BERCHTOLD; STAERK, 2014, SANDLE, 2014a).

Os meios de cultura podem ser acrescidos de lecitina de soja e polissorbato 80, com o objetivo de inativar resíduos dos agentes sanitizantes e antibióticos utilizados ou produzidos na área limpa (FARMACOPEIA..., 2010, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, USP 2016b).

#### 1.8.1.5 *Plano e frequência de Amostragem*

O plano de amostragem deve definir os locais de onde serão coletadas as amostras do ar, das superfícies e dos funcionários a fim de verificar o estado de controle microbiológico da área limpa (FDA, 2004, USP, 2016b). A definição desses locais deve representar toda a área e considerar principalmente os pontos próximos à área crítica (Grau A), onde o produto é exposto a um maior risco de contaminação. Dessa forma o monitoramento favorece o maior controle e conhecimento do ambiente em torno do produto, mas também deve considerar os riscos de contaminação pela interferência da própria ação da amostragem (PDA, 2014, SANDLE, 2012).

A área limpa deve ser amostrada em operação para avaliar as práticas assépticas durante o processo, mas também em repouso a fim de ser uma base de informação da microbiota e de comparação do nível de qualidade do ambiente atingido após a desocupação da área e a realização dos procedimentos de limpeza e desinfecção (ANVISA, 2013, SANDLE, 2012, WHO, 2012).

Os locais a serem mapeados devem contemplar o posicionamento, circulação, vestimenta e mãos dos funcionários envolvidos no processo de produção, já que são considerados os principais carreadores de contaminação dentro da área limpa. Os locais de entrada e saída de materiais e equipamentos de uma área de menor classificação, quanto à partícula total, para uma área de maior classificação também devem estar incluídos no plano de amostragem (USP, 2016b). Os locais de amostragem que não oferecem risco direto de contaminação ao produto como teto, parede e chão, podem ser incluídos no plano de amostragem de forma aleatória e, a partir dos resultados, é possível avaliar a qualidade da limpeza e

desinfecção e a necessidade de treinamento e capacitação dos funcionários envolvidos nessas atividades (USP, 2016b, WHO, 2012).

A partir dos resultados históricos do controle microbiológico de cada ambiente da área limpa é possível criar uma ferramenta de desempenho de tendência, que pode conduzir a alterações dos locais e frequências de amostragens (FARMACOPEIA..., 2010, SANDLE, 2012). O plano de amostragem pode ser dinâmico, sendo possível aumentar, diminuir ou eliminar os pontos de coleta (ANVISA, 2013, FARMACOPEIA..., 2010, USP 2016b), exceto para os ambientes Grau A e B (ANVISA, 2013). Um aumento da frequência deve ser avaliado quanto ao risco-benefício devido à chance de contaminação do ambiente de produção pelo próprio processo de amostragem e a redução pelo prejuízo ao monitoramento da microbiota (USP, 2016b).

É necessária a realização de repetidas amostragens após períodos de não utilização da área por manutenção periódica, alteração da planta, dos equipamentos, dos processos ou resistência da microbiota. Uma sala limpa em funcionamento, mas sem processo de produção, deve manter ou reduzir a amostragem (monitoramento estático) a fim de assegurar que o ambiente se encontra em controle quanto ao número de partículas viáveis e não viáveis para as diferentes classificações de ambiente. No monitoramento estático deve ser realizada a amostragem de pelo menos um ponto considerado crítico e um ponto no ambiente adjacente (PDA, 2014, WHO, 2012). O monitoramento microbiológico após os procedimentos de limpeza e desinfecção permite avaliar a eficiência dos procedimentos e o Grau de treinamento dos funcionários responsáveis por tal atividade (PDA, 2014).

O guia da Anvisa sugere a frequência de monitoramento para as diferentes classificações de ambiente de uma área limpa com e sem equipamento de fluxo unidirecional (Quadro 8). À medida que a classificação diminui, ou seja, menor for a exigência quanto ao número de partículas totais do ambiente, menor é a frequência de amostragem. Além disso, equipamentos de fluxo unidirecional inseridos em diferentes classificações de ar, apresentam frequência de amostragem diferenciada (ANVISA, 2013). A farmacopeia americana também sugere uma frequência de amostragem, independente da utilização do equipamento de fluxo unidirecional (Quadro 9). Porém, não especifica a frequência para a amostragem passiva.

A frequência de amostragem sugerida pode variar de um guia para outro, porém a definição deve ser feita baseada em uma análise de risco na área de

produção. Essa análise deve considerar a qualidade do projeto da área limpa, a condição de temperatura e umidade, o nível de ocupação da área, os equipamentos e mobiliários utilizados, as atividades desempenhadas e as características dos produtos ali produzidos. Por isso, áreas limpas com a mesma classificação de partículas totais podem apresentar planos e frequência de amostragem diferentes (HALLS, 2003, PDA, 2014, SANDLE, 2012).

Quadro 8 - Frequência de amostragem de partículas viáveis em áreas de processamento asséptico sugerida pela Anvisa.

Classificação da área limpa	Amostragem ativa do ar	Amostragem passiva do ar	Amostragem de superfície	Amostragem da luva
<b>Grau A</b>	Uma vez por turno	Durante todo o tempo de produção	Uma vez por turno	Uma vez por turno
<b>Grau B</b>	Diária	Diária	Diária	Diária
<b>Grau C</b>	Semanal	Semanal	Semanal	ND
<b>Grau D</b>	Mensal	Mensal	ND	ND
<b>EFU em área Grau B</b>	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno
<b>EFU em área Grau C</b>	Semanal	Semanal	Semanal	Semanal
<b>EFU em área Grau D</b>	Mensal	Mensal	Mensal	Mensal

ND – Não Descrito EFU – Equipamento de fluxo unidirecional  
fonte: ANVISA (2013).

Quadro 9: Frequência de amostragem em áreas de processamento asséptico sugerida pela Farmacopeia Americana.

Local de amostragem	Frequência de amostragem	
	Amostragem ativa do ar	Amostragem de superfície
Área crítica (ISO 5 ou melhor)	A cada turno de produção	No final da produção
Área adjacente à área crítica	A cada turno de produção	A cada turno de produção
Área não adjacente à área crítica	Uma vez ao dia	Uma vez ao dia

fonte: USP (2016b).

## 1.9 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS E PREVENTIVAS

Os resultados do monitoramento ambiental acima do limite de ação estabelecido ou máximo especificado exigem ações para a investigação do agente causador e assim possibilitar ações corretivas e preventivas (CAPA).

A investigação de um resultado não conforme deve abranger calibrações de equipamentos, qualidade dos materiais utilizados na amostragem, dos produtos empregados na limpeza e desinfecção e do vestuário utilizado na paramentação. Os resultados dos ensaios de requalificação do sistema de filtragem devem ser revistos e novos ensaios realizados, assim como, deve-se avaliar os procedimentos e condutas assépticas praticadas pelos funcionários. Após a conclusão da investigação, quando identificada a fonte causadora do problema, ações para a correção devem ser realizadas e ações de prevenção, estabelecidas, a fim de evitar a recorrência. As ações podem incluir revisão de processos, amostragem adicional, aumento do número de pontos para a amostragem, uso de agente desinfetante mais eficaz e treinamento e qualificação dos funcionários envolvidos direta ou indiretamente no processo de produção. Toda investigação e ação adotadas devem ser documentadas. Após a implementação das ações, é necessário o acompanhamento com o objetivo de garantir que a conduta foi assertiva para a resolução do problema (FARMACOPEIA..., 2010, ANVISA, 2013).

## 1.10 JUSTIFICATIVA

O monitoramento ambiental em área limpa de manipulação asséptica é uma das principais ferramentas utilizadas para demonstrar que o ambiente de produção de injetáveis atende as exigências de qualidade para o objetivo proposto. Pode ser empregado como um indicador de qualidade e deficiência dos equipamentos, da infraestrutura da área e dos processos. Permite verificar a eficiência do sistema de filtragem, acompanhar as práticas assépticas dos funcionários envolvidos na produção e avaliar o desempenho dos processos de limpeza e desinfecção. Portanto, o monitoramento é absolutamente necessário a fim de garantir de forma

satisfatória a qualidade nos produtos injetáveis (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015, SHINTANI, 2015b).

A legislação brasileira vigente (RDC N° 67/2007, Portaria N° 272/1998) não deixa claro quais os ensaios necessários para o monitoramento ambiental em áreas limpas para manipulação de injetáveis em farmácias. Faz-se, então, necessária a busca por legislação relacionada a boas práticas de fabricação de medicamentos injetáveis em área limpa em nível industrial (RDC N° 17/2010) e orientações de órgãos internacionais (ISO 14644-1, Farmacopeia Americana e OMS) a fim de atender às premissas de qualidade e segurança ambiental.

O controle ambiental da Central de Preparo de Medicamentos Injetáveis do estudo é realizado por duas empresas terceirizadas. Uma empresa executa os ensaios de contagem de partículas totais, bem como todos os ensaios para requalificação da área limpa, enquanto a outra empresa realiza o controle de partículas viáveis do ar, superfície e pessoal. O controle do ambiente apresenta frequência e ensaios estabelecidos, porém não está descrito em um plano de monitoramento ambiental, sendo necessária a sua elaboração a fim de adequar os processos realizados por essas empresas e as condutas a serem adotadas de forma preventiva e investigativa nos casos de resultados não conformes.

A elaboração de um plano de monitoramento ambiental robusto exige o seguimento a critérios de qualidade (calibrações de equipamentos, treinamento dos funcionários, procedimentos das condutas descritos, validação de processos e certificados de qualidade dos materiais empregados). A inclusão dessas informações no manual poderá ser empregada para o estabelecimento de critérios e exigências nos contratos com empresas terceirizadas que realizam serviços de amostragem microbiológica em farmácias de manipulação, com a finalidade de estimular melhorias nos processos agregando qualidade ao produto final, segurança aos pacientes, aos funcionários e ao ambiente de trabalho.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi elaborar um manual que contemple um plano de monitoramento ambiental a ser utilizado por qualquer Farmácia que manipule medicamentos injetáveis. Além disso, foram avaliados os procedimentos de controle microbiológico de uma área limpa de manipulação de medicamentos injetáveis anti-câncer e de suporte, nutrição parenteral e BCG em um hospital de grande porte.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as práticas de amostragem de partículas viáveis realizadas pela empresa prestadora de serviço para o hospital, e comparar os resultados com a análise de amostragem de partículas viáveis da área limpa realizada neste estudo, com o intuito de analisar criticamente o procedimento já estabelecido.
- Estabelecer os limites de alerta para o monitoramento ativo do ar das salas de manipulação e das antecâmaras e superfícies da sala de manipulação e propor as ações no caso do resultado obtido no monitoramento ambiental exceder o limite de alerta.
- Elaborar um manual que contemple o plano de monitoramento ambiental de uma Farmácia que manipule medicamentos injetáveis, bem como identificar os pré-requisitos fundamentais para essa atividade segundo as legislações e diretrizes vigentes.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE AMOSTRAGEM DE PARTÍCULAS VIÁVEIS REALIZADA PELA EMPRESA PRESTADORA DE SERVIÇO E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OS DO ESTUDO

Do período de março de 2015 a julho de 2015, os ensaios de amostragem microbiológica realizados pela empresa prestadora de serviço foram avaliados a fim de verificar se estavam de acordo com os descritos na literatura – Farmacopeia Americana (USP, 2016b e USP, 2016c), RDC Nº 17/2010 (ANVISA, 2010), Guias da Anvisa (ANVISA, 2013) e da OMS (WHO, 2012), FDA GMP (FDA, 2004) e EU GMP (EUROPEAN COMMISSION, 2008).

O acompanhamento observacional de todas as etapas de amostragem ativa do ar, superfície e pessoal, realizada pela empresa, foi executado, duas vezes por semana e por um período de 15 dias. Nessa etapa foi avaliada a técnica de amostragem dos funcionários da empresa na sala de manipulação de nutrição parenteral e de medicamentos de suporte.

De junho de 2016 a setembro de 2016 foi realizada a amostragem microbiológica do estudo simultaneamente à avaliação presencial dos ensaios realizados pela empresa prestadora de serviço. Essa avaliação consistiu em acompanhar a prática de amostragem da empresa junto à equipe de manipulação.

Em seguida, os dados obtidos no estudo foram comparados com os obtidos pela empresa.

A seguir será descrito o procedimento para a realização da amostragem microbiológica realizada neste estudo.

##### 3.1.1 Realização da amostragem de partículas viáveis no estudo

A farmácia do hospital desse estudo é constituída de duas áreas limpas. Uma área de 138 m<sup>2</sup>, subdividida em 3 unidades para manipulação de nutrição parenteral,

quimioterapia e medicamentos de suporte utilizados no tratamento quimioterápico. Cada unidade possui uma sala de manipulação, uma antecâmara e uma sala de limpeza e desinfecção. A área possui um ambiente de circulação comum com dois vestiários destinados à antissepsia das mãos e paramentação, depósito de material de limpeza e área de depósito de resíduos.

A sala de manipulação de nutrição parenteral (Grau C) contém dois equipamentos de fluxo unidirecional horizontais (EFU 1 e 2) e pressão positiva em relação à sala adjacente. A sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos (Grau C) possui duas cabines de segurança biológica (CSB 3 e 4) e pressão negativa em relação à sala adjacente e a sala de manipulação de medicamentos de suporte (Grau C) contém 3 CSB (CSB 5, 6 e 7) e pressão negativa em relação à sala adjacente.

A área de manipulação de BCG fica localizada em uma área a parte com 12 m<sup>2</sup> e contém uma sala de limpeza e desinfecção (Grau D), uma sala de manipulação (Grau D) com pressão negativa em relação à sala adjacente e uma CSB.

Do período de 2015 a início de junho de 2016, a manipulação dos medicamentos quimioterápicos e medicamentos de suporte foi realizada na sala de manipulação de quimioterápicos, devido à manutenção nas CSB da sala de manipulação dos medicamentos de suporte. No início de junho de 2016 a 30 de agosto de 2016, período de amostragem microbiológica realizado no estudo, as CSB da sala de manipulação de quimioterápicos entraram em manutenção, e a manipulação dos medicamentos quimioterápicos e de suporte foi realizada em uma única sala, na sala de manipulação dos medicamentos de suporte. A manipulação de medicamentos quimioterápicos foi realizada na CSB 7 e a de medicamentos de suporte na CSB 6. A CSB 5 estava inutilizada.

A partir de 31 de agosto de 2016 com o término da manutenção nas CSB 3 e 4 da sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos, a manipulação desses medicamentos retornou para a sala de origem (sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos). Com isso, a manipulação de medicamentos de suporte foi realizada em sala diferente da dos medicamentos quimioterápicos até setembro de 2016, término da amostragem no estudo.

A amostragem de partículas viáveis na área limpa, realizada por esse estudo foi no período de junho de 2016 a setembro de 2016. Nesse período foram

realizadas amostragens do ar pelo método ativo e passivo. As amostragens foram realizadas nos mesmos dias e turnos realizados pela empresa.

### 3.1.2 Materiais utilizados nas amostragens realizadas no estudo

O monitoramento ativo do ar foi realizado através do instrumento *Microbial Air Monitoring Systems* (MAS 100® Merck) cedido por Bio-Manguinhos e calibrado a cada 3 meses pelo Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV).

Para a amostragem ativa e passiva do ar foram empregadas placas de 90 mm com meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) (Biocen) e placas de 90 mm com meio de cultura Sabouraud Dextrose 4% (SBD) (Plastlabor). O meio de cultura TSA foi cedido pela Seção de Meio de Cultura (SEMEC) de Bio-Manguinhos e o meio SBD 4% foi adquirido para realização do estudo.

As tampas dos amostradores utilizados na amostragem ativa foram esterilizadas pela Seção de Lavagem e Esterilização de Materiais (SEEST) de Bio-Manguinhos.

### 3.1.3 Amostragem ativa do ar

Com o equipamento MAS 100® e placas de 90 mm de TSA e SBD 4% foram amostrados 1.000 litros de ar ( $1 \text{ m}^3$ ) por um período de 10 minutos em cada ponto definido na planta da área limpa, conforme Anexo A. A amostragem ativa de partículas viáveis do ar foi realizada nas salas de manipulação de medicamentos de suporte nos pontos 16a, 17a, 18a e 22a no período de 14 de junho de 2016 a 28 de setembro de 2016. Os pontos 19a, 20a, 21a e 23a, da mesma sala foram amostrados a partir de 02 de agosto de 2016 a 21 de setembro de 2016. Na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos, os pontos 11a, 12a e 13a foram amostrados do período de 31 de agosto de 2016 a 21 de setembro de 2016 e, os pontos 14a e 15a, no período de 31 de agosto de 2016 a 28 de setembro do mesmo

ano. Os pontos 8a, 9a e 10a não foram amostrados, pois a CSB 3 não foi utilizada para a manipulação durante o período do estudo. A amostragem nas salas de manipulação de medicamentos quimioterápicos e de suporte foi realizada durante as atividades de manipulação.

Na sala de manipulação de nutrição parenteral, a amostragem foi realizada nos pontos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a e 7a no período de 7 de junho de 2016 a 26 de julho de 2016. A amostragem na sala de manipulação de nutrição parenteral foi realizada imediatamente após a limpeza e desinfecção da sala, na ausência de funcionários e materiais, conforme rotina do setor.

#### 3.1.4 Amostragem passiva do ar

A amostragem foi realizada com a exposição de placas de 90 mm de TSA em cada ponto de amostragem definido na planta da área limpa (Anexo B) e trocadas a cada 2 horas por um período total de 4 horas. Dessa forma, a exposição das placas cobriu um turno de manipulação. A amostragem passiva de partículas viáveis do ar foi realizada nas salas de manipulação de nutrição parenteral durante a atividade de manipulação nos pontos 1p, 2p e 3p no período de 7 de junho de 2016 a 26 de julho de 2016. Na sala de manipulação de medicamentos de suporte, a amostragem foi realizada durante as atividades no período de 14 de junho de 2016 a 24 de agosto de 2016 nos pontos 4p (interior da CSB 7), 5p, 6p e 7p. Não foi realizada a amostragem passiva na CSB 6, utilizada para o preparo de medicamentos de suporte, por indisponibilidade de placas para a amostragem.

#### 3.1.5 Incubação das amostras

As placas amostradas na área limpa para o estudo foram transportadas e incubadas no mesmo dia da amostragem, exceto as placas de amostragem passiva de ar obtidas na sala de manipulação de nutrição parenteral. Esse tipo de

amostragem ocorreu durante a manipulação no período da tarde, logo o transporte e a incubação ocorreram no dia seguinte.

A incubação das placas foi realizada na Seção de Esterilidade, Processos e Insumos (SEPIN) do Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) de Bio-Manguinhos, seguindo o padrão interno do laboratório.

As placas com meio TSA para favorecer o crescimento de bactérias foram incubadas a 30-35°C por 6 dias, as placas com meio SBD 4% para propiciar o crescimento de fungos foram incubadas a 20-25 °C por 5-6 dias. Após a incubação das placas foi realizada a leitura para verificar o crescimento e quantificar o número de colônias bacterianas e fúngicas.

As placas utilizadas para a amostragem eram acondicionadas em embalagem contendo 10 unidades. De cada embalagem foi retirada 1 placa para realizar o controle negativo.

Em relação ao controle microbiológico realizado pela empresa terceirizada, o monitoramento de partículas viáveis do ar da área limpa foi realizado pelo método ativo, por meio dos equipamentos MAS 100® (Merck) e Air Ideal® 3P (BioMérieux). Os equipamentos foram programados para captar 1.000 litros de ar por um período de 10 minutos. Para a amostragem foram empregadas placas de 90 mm com meio de cultura TSA e placas de 90 mm com meio de cultura SBD 4%, ambas produzidas pela própria empresa prestadora de serviço de amostragem.

A amostragem passiva não foi realizada, pois não fazia parte da rotina de amostragem do monitoramento da área limpa. A amostragem de partículas viáveis do ar por amostragem ativa foi realizada duas vezes por semana nas CSB e EFU e em cada unidade para manipulação (nutrição parenteral, medicamento quimioterápicos e de suporte).

A incubação e a leitura das placas para verificar a presença e a contagem de colônias foram realizadas no laboratório da empresa prestadora de serviço. As placas com meio de cultura TSA para favorecer o crescimento de bactérias foram incubadas a 35°C por 2 dias e as placas com meio SBD 4% para favorecer o crescimento de fungos foram incubadas a 25 °C por 7 dias.

3.1.6 Análise estatística dos resultados da amostragem do ar realizados no estudo e pela empresa

Para a análise estatística dos resultados obtidos na amostragem ativa do ar foi utilizado o Programa R Software versão 3.1.3. Para verificar a normalidade dos dados foi feito o teste de hipótese Shapiro-Wilk. Para comparação dos grupos que apresentaram um comportamento não normal foi realizado o teste Wilcoxon – Mann Whitney e para os resultados com distribuição normal, o teste *t-student*.

Para avaliar os resultados obtidos em um mesmo local por dois métodos de amostragem (pontos 22a e 7p) foi realizada uma normalização dos dados em função do limite máximo permitido para cada método (50 para a amostragem passiva e 100 para a amostragem ativa) e aplicado o teste *t-student*.

### 3.2 ESTABELECIMENTO DOS LIMITES DE ALERTA E PROPOSTA DE AÇÕES NO CASO DO RESULTADO NO MONITORAMENTO AMBIENTAL EXCEDER O LIMITE DE ALERTA.

Para determinação dos limites de alerta por amostragem ativa do ar das salas de manipulação da nutrição parenteral, quimioterapia, medicamentos de suporte e BCG e suas respectivas antecâmaras e das superfícies das salas de manipulação foram utilizados os resultados históricos das amostragens realizadas pela empresa prestadora de serviço. O período coletado para análise dos resultados do ar e da superfície foi de agosto de 2015 a setembro de 2016.

Os limites de alerta para cada ponto amostrado na área limpa do estudo foram calculados pelo método *Cutoff Value Approach*, um dos métodos descritos no Guia PDA *Technical Report Nº13 - Fundamentals of an Environmental Monitoring Program* publicado em 2014 e também utilizado pela empresa Bio-manguinhos.

Os valores acima do limite máximo estabelecido pelas agências reguladoras foram excluídos dos cálculos, pois poderiam gerar valores de limites de alerta altos, inclusive acima do máximo especificado pela legislação.

Para o cálculo foi necessário estabelecer a frequência absoluta para cada valor encontrado, seguido de cálculo da frequência relativa e posteriormente a frequência relativa cumulativa. O resultado correspondente ao percentil 95% foi determinado como o limite de alerta.

As informações descritas no Manual quanto às propostas de ações caso um resultado exceda o limite de alerta foram baseados na Farmacopeia Brasileira, no Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica publicada pela Anvisa em 2013 e no *Guia PDA Technical Report Nº13 - Fundamentals of an Environmental Monitoring Program de 2014*.

### 3.3 ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

Os procedimentos, as condutas e os pré-requisitos descritos no manual foram baseados em orientações dos seguintes documentos, por serem informações bem consolidadas e seguras:

#### **Farmacopeias:**

- Brasileira (FARMACOPEIA..., 2010);
- Americana (USP, 2011; USP, 2016b; USP, 2016c);
- Japonesa (JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011).

#### **Legislações e diretrizes nacionais:**

- Resolução da Diretoria Colegiada Nº 17, de 16 de abril de 2010 (ANVISA, 2010);
- Resolução da Diretoria Colegiada Nº 67, de 8 de outubro de 2007 (ANVISA, 2007);
- Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica (ANVISA, 2013);
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2005 e ABNT, 2009).

**Diretrizes e normas internacionais:**

- *Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities* (WHO, 2012);
- *Good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products* (WHO, 2011);
- *Guidance on the Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Produced by Terminal Sterilization* (GUIDANCE..., 2012);
- *Guidance for Industry: Sterile Drug products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice* (FDA, 2004);
- *PDA Technical Report nº13 - Fundamentals of an Environmental Monitoring Program* (PDA, 2014);
- *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice: Medicinal Products for Human and Veterinary Use Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products* (EUROPEAN COMMISSION, 2008);
- *International Organization for Standardization* (ISO, 2015a, ISO, 2015b, ISO, 2000 e ISO, 2003);

**Livros sobre o tema:**

- *Microbiological Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms* (HALLS, 2003);
- *Controle Biológico de qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos* (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015);
- *Cleanroom Technology. Fundamental of Design, Testing and Operation* (WHYTE, 2003).

Os artigos utilizados sobre o tema ajudaram no embasamento e compreensão dessas informações. Além disso, foram realizados seis encontros entre o período de setembro de 2016 a fevereiro de 2017, utilizando a ferramenta de gestão

*brainstorming*\* e *benchmarking*\*\* com profissionais do Departamento da Garantia de Qualidade (DEGAQ) da empresa pública Bio-Manguinhos para melhor entendimento sobre as condutas e investigações em casos de desvios dos resultados do monitoramento ambiental. A escolha dessa empresa se deu pela disponibilidade e receptividade dos funcionários, já que pertencem a uma empresa pública federal, produtora de medicamentos injetáveis, e conseqüentemente pela *expertise* apresentada por seu quadro funcional em Programa de Monitoramento Ambiental (PMA).

O período de elaboração do manual foi de setembro de 2015 a fevereiro de 2017.

---

\*Benchmarking – Consiste no processo de busca das melhores práticas numa determinada indústria e que conduzem ao desempenho superior. É visto como um processo positivo e através do qual uma empresa examina como outra realiza uma função específica a fim de melhorar a forma como realiza a mesma ou uma função semelhante.

\*\*Brainstorming – (**tempestade de ideias**) - A técnica propõe que um grupo se reúna e utilize a diversidade de pensamentos e experiências para gerar soluções inovadoras, sugerindo qualquer ideia que vier à mente a respeito do tema tratado. Com isso, espera-se reunir o maior número possível de ideias, visões, propostas e possibilidades que levem a um denominador comum e eficaz para solucionar problemas e entraves que impedem um projeto de seguir adiante.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DAS PRÁTICAS DE AMOSTRAGEM MICROBIOLÓGICA REALIZADA PELA EMPRESA PRESTADORA DE SERVIÇO

A avaliação dos procedimentos realizados pela empresa e o acompanhamento das amostragens de partículas viáveis, teve como objetivo conhecer as práticas realizadas pela empresa contratada e compará-las com as orientações descritas na literatura, além de acompanhar e avaliar o grau de conhecimento do processo de amostragem apresentado pelos funcionários da empresa contratada.

Durante o período de acompanhamento foi identificado que os funcionários da empresa contratada, assim como os funcionários da produção não tinham treinamento quanto aos procedimentos de amostragem. Segundo, o Guia de qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica publicado pela Anvisa (2013) e o Guia PDA *Technical Report N° 13* (2014), são fundamentais a realização de treinamento teórico, a existência de procedimentos escritos para a execução das atividades e da planta baixa da área com os pontos estabelecidos para a amostragem.

As amostragens de superfícies consideradas críticas para o processo de manipulação como a superfície interna da CSB e de materiais em seu interior foram, muitas vezes, realizadas sem o conhecimento ou autorização do manipulador. A luva do manipulador, também considerada uma superfície crítica devido à proximidade com o produto estéril, foi amostrada durante a manipulação sem o cuidado de troca após a amostragem. Assim, foi observado que os funcionários da empresa e da produção não tinham o conhecimento sobre a importância de se estabelecer momentos corretos para a execução das amostragens. Segundo Pinto, Kaneko e Pinto (2015) e Halls (2004), a amostragem da luva do manipulador pode ser realizada em diferentes fases do processo de produção, embora, guias de monitoramento ambiental como a Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana, FDA GMP, EU GMP, OMS TRS 961 e JP GMP, descrevam que ao término da produção seja o momento ideal para a amostragem das superfícies consideradas

críticas para o processo produtivo. A amostragem das luvas em diferentes fases do processo de produção tem o objetivo de indicar as práticas de colocação das luvas, fornecer dados diretos relativos às atividades e ser indicador de técnica asséptica (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Contudo, há consenso da importância de se trocar as luvas após a amostragem, bem como remover o resíduo do meio de cultura da superfície amostrada a fim de se evitar a disseminação do resíduo do meio de cultura na área de trabalho e risco de proliferação microbiana no ambiente de produção (PDA, 2014, USP, 2016b, USP, 2016c). Também é descrito que a própria atividade de limpeza e desinfecção de superfícies críticas amostradas, durante o processo de produção, pode favorecer a contaminação pela interrupção da rotina e até mesmo pela quebra do fluxo de ar (USP, 2016b, FARMACOPEIA..., 2010).

Outra questão observada foi que algumas amostragens realizadas pela empresa, principalmente nas CSB de preparo de medicamentos de suporte, onde se avaliava o ar, a superfície e a luva do manipulador, ocorriam durante a substituição do manipulador por outro, não concluindo assim todas as análises com apenas um funcionário específico. Isso ocorria geralmente no turno de troca de almoço, em que havia a substituição temporária do manipulador por outro, de outro turno, para assumir as atividades. Com isso, a análise de ar era feita com um manipulador e a luva e a superfície com outro. Nesse momento de troca temporária, não havia descarte dos materiais utilizados na manipulação pelo primeiro manipulador (agulhas, seringas, gases). Portanto, considera-se fundamental a mudança dessa rotina de amostragem de forma que seja permitida a rastreabilidade dos procedimentos executados pelos envolvidos, como também dos materiais e dos processos, pois caso haja um desvio, as medidas corretivas possam ser prontamente viabilizadas.

Da mesma forma, foi observada a realização da amostragem do ar das CSB pelo método ativo em momentos de intervalos da manipulação em que não havia funcionários ou atividades em execução. Esse tipo de monitoramento vai de encontro aos objetivos do monitoramento ambiental em operação, que é avaliar a condição do ambiente de produção, quanto à carga microbiológica, durante as atividades, principalmente em áreas críticas (Grau A) (EUROPEAN COMMISSION, 2008, WHITE, 2003, FARMACOPEIA..., 2010, USP, 2016b). Após a repetição de tais condutas, foi constatada a necessidade de treinamento das equipes e elaboração de procedimentos escritos para a execução das atividades.

Durante a avaliação dos procedimentos e acompanhamento das atividades foi observada ausência de informações quanto à data de calibração dos equipamentos utilizados na amostragem ativa do ar e dos laudos de fertilidade e de esterilidade dos meios empregados na amostragem. Segundo Shintani (2015b) e o Guia de qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica publicada pela Anvisa (2013), essas informações fazem parte da garantia da qualidade e são imprescindíveis em um plano de monitoramento ambiental. Esses dados são importantes a fim de garantir precisão e confiabilidade de medição pelo equipamento e qualidade e eficácia do meio de cultura na recuperação da microbiota da área limpa. Em situações de investigação de desvio, uma das ações a serem realizadas é o rastreamento da documentação dos materiais e equipamentos utilizados no dia da amostragem (PDA, 2014, GUIDANCE..., 2012). A disponibilidade dessas informações torna-se fundamental para a determinação ou não de uma falha no processo de amostragem ou até mesmo como a fonte de contaminação.

Da mesma forma, os equipamentos utilizados na amostragem ativa do ar foram dedicados à área limpa do estudo, porém, a tampa do amostrador, peça do equipamento por onde o ar amostrado passa antes de impactar no meio de cultura estéril, não foi esterilizada a cada sessão de amostragem, e sim desinfetada com o desinfetante não estéril padronizado no hospital. Logo, um laudo falso-positivo para contaminação do ar por amostragem ativa no interior da CSB ou do EFU poderia gerar ações drásticas de investigação de limpeza, de ensaios para averiguar a funcionalidade da CSB e do EFU e de reamostragens, levando a paralização das atividades e até ao cancelamento do atendimento aos pacientes, o que poderia gerar insegurança para a equipe quanto aos procedimentos realizados no processo produtivo.

Os métodos de amostragem realizados pela empresa em consenso com a Seção de Farmácia foram avaliados a fim de confirmar se os procedimentos estavam de acordo com o descrito na literatura. Foi identificada a realização de um método para amostragem do ar sem referência na literatura, denominado “varredura”, método esse com o objetivo, assim exposto pelas duas partes, de avaliar a qualidade do ar insuflado através do filtro absoluto no interior da CSB ou do EFU. Esse método consiste em amostrar o ar insuflado do filtro absoluto da CSB e EFU em uma placa com meio de cultura através de movimentos circulares por toda a

extensão do filtro absoluto. Para a sua execução era necessária grande intervenção do funcionário da empresa no ambiente de produção. Como o método “varredura” não está documentado em nenhuma literatura, não há estabelecido tempo e volume de amostragem, não tendo sua eficiência comprovada.

Uma forma de avaliar a qualidade microbiológica do ar proveniente de um filtro absoluto em uma área Grau A, bem como verificar a sua eficiência, ocorre através da realização do monitoramento ambiental de partículas viáveis e totais com o ambiente em repouso, de acordo com a literatura consultada. Segundo a Anvisa, na Resolução RDC nº 17/2010, esses ensaios devem ser realizados após o tempo de recuperação da área limpa. A WHO (2011) e Sandle (2012) descrevem que, o ensaio em repouso permite avaliar a eficiência do sistema de filtragem no restabelecimento da qualidade do ar e conhecer o nível de biocontaminação do ambiente sem a interferência humana, de materiais e de atividades no momento da amostragem.

A Farmacopeia Americana descreve os riscos de contaminação em uma área Grau A, com possível consequência de contaminação do produto ou de um resultado falso-positivo, devido aos métodos manuais e dependentes da intervenção humana para a amostragem. Nesses casos, quando o risco excede o benefício, é possível eliminar a amostragem, desde que justificada (ANVISA, 2013). No entanto, procedimentos considerados invasivos e sem respaldo na literatura são injustificáveis. Diante dos dados, foi recomendada a exclusão do método “varredura” no plano de monitoramento ambiental da área limpa em estudo.

Outro método avaliado na rotina de monitoramento foi a amostragem das luvas dos funcionários em áreas Grau C. O laudo emitido pela empresa descrevia como limite máximo permitido até 20 UFC/placa, referenciado pela USP-30 (2007). Foi realizada uma busca nas edições da Farmacopeia Americana e visto que até 2011, o capítulo <1116> aceitava um limite máximo de crescimento de micro-organismos nas luvas dos funcionários em área Grau C de até 10 UFC/placa e não 20 UFC/placa, como referenciado no laudo da empresa. Em 2012, o capítulo <1116> foi completamente revisado e com a atualização foi proposta uma análise diferente para a tomada de ações em casos de desvios, de forma a considerar a taxa de incidência da contaminação durante um determinado período e excluído os limites aceitáveis com valores absolutos para crescimento de micro-organismo nas amostragens realizadas no ar, superfícies e pessoal.

Sendo assim, foi realizada uma revisão em todos os guias de monitoramento ambiental de 2004 até os mais recentes (FDA GMP, EU GMP, JP GMP, PDA *Technical Report N°13*, WHO *Technical Report Series, N° 961*), bem como nas Farmacopeias Brasileira, Americana, Europeia e Japonesa e na legislação nacional, Resolução RDC N° 17/2010 e no Guia da Anvisa - Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica (2013), não sendo identificado em nenhum dos documentos citados o limite máximo permitido de micro-organismo na superfície da luva de funcionários em ambiente Grau C. Considerando a ausência de informação na literatura pesquisada, que o capítulo <1116> da Farmacopeia Americana é um capítulo não obrigatório e sim de recomendação de boas práticas (WEISSFELD, 2013), e que ainda o ambiente Grau C para a indústria farmacêutica é um ambiente não crítico para o processo produtivo devido às atividades ali realizadas (EUROPEAN COMMISSION 2008, ANVISA, 2010), concluiu-se que esse tipo de amostragem em um plano de monitoramento ambiental para indústria farmacêutica é de baixa relevância. Contudo, em farmácias de manipulação, onde a área Grau C circunda a área Grau A (Resolução RDC N° 67/2007), e que no ambiente Grau C ficam os materiais não estéreis e estéreis, embalados em material plástico ou de papel, empregados no processo de manipulação, há o risco de carreamento de contaminantes provenientes desses materiais para o interior do ambiente Grau A através das mãos dos funcionários, principalmente quando práticas assépticas e de limpeza e desinfecção são mal conduzidas (SANDLE, 2014b). Apesar deste método de monitoramento ambiental não estar mais descrito na Farmacopeia Americana e considerando os riscos apresentados por Sandle (2014b), torna-se importante a manutenção deste procedimento e, fundamental por parte da legislação nacional, a determinação de limites aceitáveis para esse tipo de amostragem para farmácias de manipulação de medicamentos estéreis a fim de ser um indicador de condutas de higiene e de processo.

Outro ponto avaliado e comparado com a literatura foi quanto aos meios empregados pela empresa nas amostragens do monitoramento ambiental. Foi verificado o uso do meio ágar sangue para as amostragens das luvas dos funcionários e das mãos após a antissepsia. Segundo Gordon et al (2014) e Sandle (2014a), não é unânime a definição do meio a ser empregado em um programa de monitoramento ambiental, bem como as condições de temperatura, tempo e ordem

de incubação. Porém, Pacheco e Pinto (2010) e Sandle (2011), recomendavam o emprego de meios não específicos, como meio de caseína/soja, para o monitoramento das luvas. As Farmacopeias Americana e Brasileira recomendam o emprego desses meios a fim de favorecer a recuperação da maioria das bactérias e fungos da microbiota da área limpa e, em caso de necessidade de identificação de um micro-organismo específico, recomendam a utilização de um meio seletivo. Com base nessas informações e a fim de adequar os procedimentos à legislação nacional foi estabelecido utilizar o meio TSA para a amostragem das luvas dos manipuladores. Essa adequação poderá permitir comparar os resultados obtidos com os resultados da literatura.

## 4.2 REALIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM MICROBIOLÓGICA NO PRESENTE ESTUDO E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS PELA EMPRESA

### 4.2.1 Amostragem ativa do ar

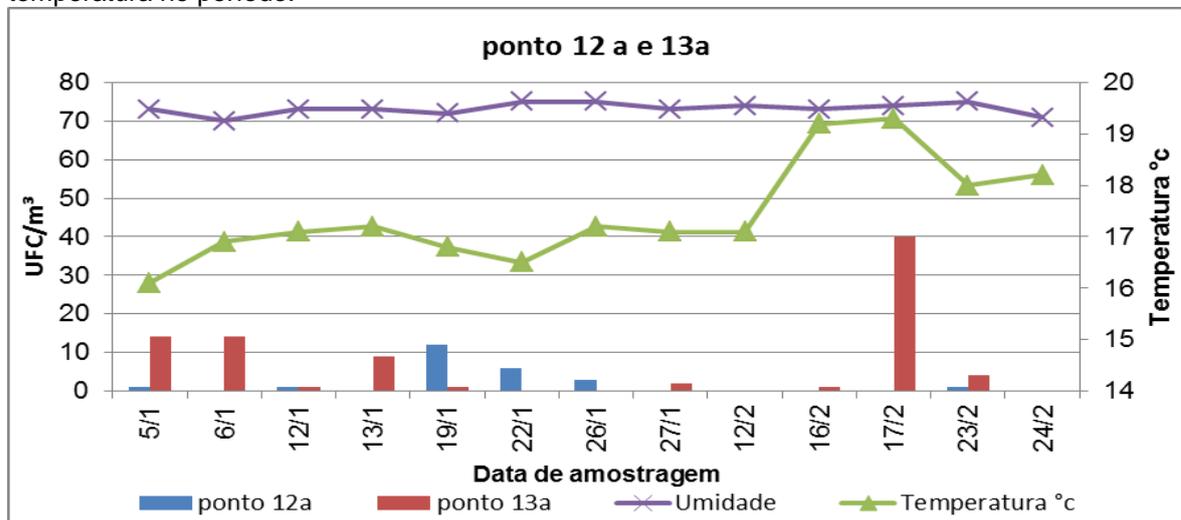
#### 4.2.1.1 *Avaliação dos resultados da análise do ar realizados pela empresa*

Foi feita uma avaliação dos resultados emitidos pela empresa, da amostragem do ar pelo método ativo nas salas de manipulação da nutrição parenteral e quimioterapia (ambas Grau C) no período anterior à amostragem feita no presente estudo.

Na sala de manipulação de nutrição parenteral, no período de agosto de 2015 a maio de 2016 foram analisados 170 laudos referentes a quatro pontos amostrados (ponto 2a, 3a, 5a e 6a – Anexo A), sendo 44 laudos dos pontos 2a, 44 laudos do ponto 3a, 41 laudos do ponto 5a e 41 laudos do ponto 6a. Os resultados dos pontos 2a e 3a mostraram que em 25 laudos (55,6%) e em 18 laudos (40,9%), respectivamente, nenhuma UFC/m<sup>3</sup> foi obtida. Nos pontos 5a e 6a, foram analisados 41 laudos de cada ponto, sendo obtidos resultados negativos em 27 laudos (65,8%) de cada ponto (zero UFC/m<sup>3</sup>).

Para a sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos (Grau C) foram avaliados os laudos de dois pontos de amostragem, ponto 12a e 13a em frente a CSB 4 nos meses de janeiro e fevereiro de 2016 (pontos no Anexo A). No gráfico 1 são apresentados esses resultados. Foi obtido um número reduzido de colônias nesses dois pontos amostrados. Em 13 resultados, seis (46,1%) e quatro (30,8%) não apresentaram crescimento de colônias nos pontos 12a e 13a, respectivamente.

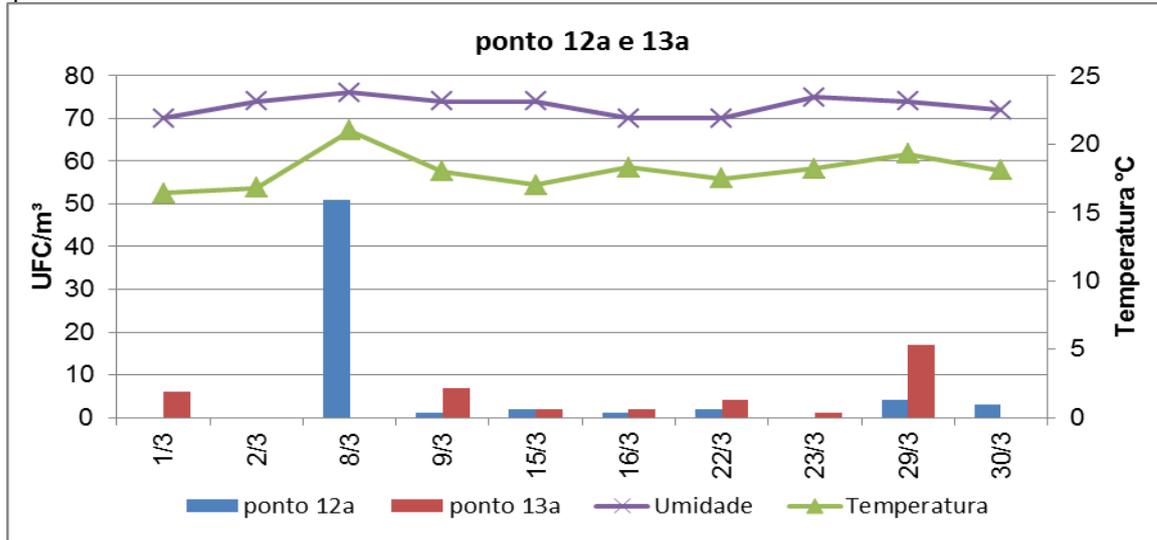
Gráfico 1 - Resultados das amostragens em dois pontos na sala de manipulação de quimioterápicos (meses de janeiro e fevereiro de 2016) e o registro de umidade e de temperatura no período.



— A escala de umidade é a mesma escala de contagem microbiana (UFC/m<sup>3</sup>).

No mês de março ocorreu a interdição da sala de manipulação de medicamentos de suporte para manutenção, sendo todas as atividades de manipulação transferidas para a mesma sala de manipulação (sala de manipulação de quimioterápicos). Os resultados dos mesmos pontos (12a e 13a) da sala de manipulação de quimioterápicos, porém, em condições de ocupação diferentes, estão mostrados no gráfico 2.

Gráfico 2 - Resultados de amostragem em dois pontos na sala de manipulação de quimioterápicos no mês de março de 2016 e o registro de umidade e de temperatura no período.



— A escala de umidade é a mesma escala de contagem microbiana (UFC/m<sup>3</sup>).

Os resultados indicam que embora tenha dobrado o número de funcionários trabalhando na sala e o fluxo de materiais, foi observado que a recuperação de colônias nas placas se manteve reduzida. O alto crescimento verificado no dia 8/03/2016, gráfico 2, pode ser devido a alta temperatura e umidade registradas no dia (21,3°C e 79% respectivamente). Dos 20 resultados analisados, seis (30%) apresentaram resultado negativo (zero UFC/m<sup>3</sup>). Esses resultados divergem do descrito na literatura, pois estudos indicam que o estado de ocupação da área assim como o nível de atividades estão diretamente relacionados ao aumento de partículas no ambiente (FAVERO et al, 1966, SANDLE et al, 2014a).

Devido a esses resultados, foi decidido no presente estudo realizar amostragem ativa dos mesmos pontos realizados pela empresa. Na época da amostragem, a sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos estava fechada devido à manutenção. Com isso, a manipulação dos medicamentos quimioterápicos e dos medicamentos de suporte foi realizada na mesma sala, sala de manipulação de medicamentos de suporte.

#### 4.2.1.2 Avaliação dos resultados da análise do ar realizados no estudo

Na sala de manipulação de nutrição parenteral, no período de junho a julho de 2016, foram amostrados a sala (Grau C) e os EFU 1 e 2 (Grau A) - pontos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a e 7a – Anexo A.

De acordo com a rotina estabelecida pelo Setor de Nutrição Parenteral, a amostragem ativa dos EFU 1 e 2 e da sala de manipulação de nutrição parenteral foi realizada imediatamente após a limpeza e desinfecção dos mobiliários e dos equipamentos e com a sala sem atividades. Não foi autorizada a amostragem da sala e dos EFU em operação. A variação de temperatura no período amostrado foi de 15,5-18,5°C e a média de umidade foi 76,2%.

A amostragem ativa nos pontos 1a e 4a (ambiente Grau A) apresentou resultado negativo (zero UFC/m<sup>3</sup>), tanto no estudo quanto pela empresa. A amostragem no ponto 2a realizada no estudo mostrou crescimento microbiano de 2 UFC/m<sup>3</sup> no dia 07/06/2016 e, no ponto 7a, crescimento de 3 UFC/m<sup>3</sup> no dia 08/06/2016 e 1 UFC/m<sup>3</sup> no dia 12/07/2016. Nos demais dias de amostragem, bem como, nos demais pontos foi verificada ausência de crescimento microbiano.

No dia 12/07/2016, o resultado da amostragem realizada pela empresa no ponto 5a apresentou alta contagem de colônia (61 UFC/m<sup>3</sup>) e, no ponto 3a, crescimento de 10 UFC/m<sup>3</sup> no dia 13/07/2016. A alta contagem de colônias identificada pela empresa no ponto 5a diverge do resultado histórico da sala. Esse resultado isolado pode ser devido a um erro de amostragem, pois os demais resultados amostrados na sala no mesmo dia foram zero UFC/m<sup>3</sup> e 1 UFC/m<sup>3</sup> referente aos pontos 6a e 8a, respectivamente. Todos os resultados do ponto 6a amostrado durante o período de estudo deram resultado negativo (zero UFC/m<sup>3</sup>).

Os principais micro-organismos identificados nos pontos 2a, 3a e 7a foram fungos filamentosos e no ponto 5a bactérias.

Um estudo realizado por Favero et al (1966) mostrou que em uma área limpa com fluxo unidirecional horizontal, diferentes condições no ambiente de produção como fluxo de atividades, materiais e funcionários podem influenciar no número de partículas viáveis e após a área atingir o estado de repouso, a contagem de colônias tende a zero. Em outro estudo conduzido por Sandle, Leavy e Rhodes (2014) foi obtida baixa contagem de colônias em uma área Grau B em repouso devido à eficiência do sistema HVAC e filtro absoluto, alto fluxo de ar e ausência de funcionários na área. Portanto, baseado nos resultados históricos das amostragens realizadas pela empresa antes do estudo, nos resultados obtidos no estudo e nos

artigos citados acima foi concluído que a sala de nutrição parenteral consegue manter baixo o nível de partículas viáveis, mesmo com a umidade alta da sala (média 75%). Esse resultado foi atribuído ao bom desempenho do sistema HVAC, ao alto rigor da limpeza e desinfecção da sala e dos mobiliários, ao estado de ocupação (em repouso) da sala no momento da amostragem e as condições rigorosas de paramentação, alinhada ao domínio das condutas assépticas praticadas pelos funcionários (ABREU; PINTO; OLIVEIRA, 2003). Porém, é considerado fundamental conhecer o nível de contaminação por partículas viáveis, na sala de manipulação (Grau C) e no EFU (Grau A) durante o processo de manipulação. O resultado desse tipo de amostragem, não elimina os riscos de contaminação do produto manipulado, indica apenas que o sistema de filtragem está qualificado para uso. Os ensaios de monitoramento do ambiente de produção em operação são considerados essenciais e têm o objetivo de verificar o nível de partículas viáveis alcançado durante as atividades permitindo avaliar o desempenho dos equipamentos de filtragem e o grau de comprometimento do ambiente e do produto durante o processo de manipulação proveniente do fluxo de materiais, pessoas e condutas dos funcionários (FARMACOPEIA..., 2010, SANDLE, 2012). Logo, diante do exposto considera-se primordial a revisão dos procedimentos de monitoramento no ambiente de manipulação de nutrição parenteral a fim de incluir a amostragem do ar em operação.

Na sala de manipulação de medicamentos de suporte foram amostrados os pontos 16a, 17a, 18a e 22a no período de junho a setembro de 2016 (Anexo A). Os pontos 19a, 20a, 21a e 23a não foram amostrados, inicialmente, por limitação de placas com meio de cultura disponíveis e tempo para amostragem. Com a interrupção da amostragem na sala de manipulação de nutrição parenteral em 27/07/2016, iniciou-se a amostragem desses pontos em 02/08/2016.

Os resultados obtidos nos pontos 16a e 19a (Grau A) mostraram ausência de crescimento de colônias, conforme esperado para um ambiente com essa classificação (ANVISA, 2013, EUROPEAN COMMISSION, 2008).

A comparação estatística dos resultados obtidos no estudo e pela empresa nos pontos 17a, 18a, 20a, 21a e 23a foram colocados na tabela 1. Nesta comparação adotamos o teste bilateral uma vez que tínhamos como objetivo avaliar se os resultados eram estatisticamente iguais.

Tabela 1 - Comparação da recuperação de colônias totais obtidas na amostragem ativa do ar na área de manipulação de medicamentos de suporte, realizada no estudo e pela empresa.

Pontos de amostragem	p-valor*
17a	0,6142
18a	0,3546
20a	0,1563
21a	0,8339
23a	0,674

\*teste Wilcoxon–Mann Whitney, teste bilateral,  $\alpha=0,05$

Através do teste de Wilcoxon – Mann Whitney foi possível identificar pelo p-valor que nos pontos 17a, 18a, 20a, 21a e 23a, não há diferença significativa na recuperação de colônias totais nas amostragens realizadas tanto no estudo quanto pela empresa para um teste bilateral pareado. Nos pontos 20a, 21a e 23a, devido aos poucos resultados obtidos durante o estudo, os dados não podem ser considerados conclusivos.

Foi realizada a comparação da recuperação de colônias de bactérias e fungos nas amostragens realizadas no estudo e pela empresa, disposto na tabela 2. Para este estudo adotou-se o teste unilateral à direita uma vez que tínhamos como objetivo avaliar se os resultados ao longo desse estudo eram estatisticamente maiores que os resultados obtidos pela empresa contratada.

Tabela 2 - Comparação da recuperação de colônias de bactérias e fungos na amostragem ativa do ar na área de manipulação de medicamentos de suporte, realizada no estudo e pela empresa.

Pontos de amostragem	Comparação entre a recuperação do estudo e da empresa	p-valor*
17a	bactéria	0,003175
	fungo	0,6339
18a	bactéria	0,00499
	fungo	0,3614
20a	bactéria	0,02953
	fungo	0,1466
21a	bactéria	0,8676
	fungo	0,2002
23a	bactéria	0,4270
	fungo	0,5557

\*teste Wilcoxon–Mann Whitney, teste unilateral à direita,  $\alpha=0,05$

Foi verificado que nos pontos 17a, 18a e 20a, a recuperação de colônias de bactéria no estudo foi mais eficiente que o da empresa ( $\alpha=5\%$  teste unilateral à direita). Já ao comparar a recuperação fúngica, observa-se pelo p-valor que não é possível comprovar a maior eficiência na recuperação de fungos no estudo ( $\alpha=5\%$  teste unilateral à direita). Essa maior recuperação de bactérias no estudo pode ser justificada pelo maior tempo de incubação das placas em temperatura a 30-35°C.

Nos pontos 21a e 23a, não há comprovação de que a recuperação de colônias de bactérias e fungos no estudo tenha sido mais eficiente do que a recuperação feita pela empresa. No entanto, devido aos poucos resultados obtidos durante o estudo nos pontos 20a, 21a e 23a, os dados estatísticos obtidos não podem ser considerados conclusivos, apenas indicativos.

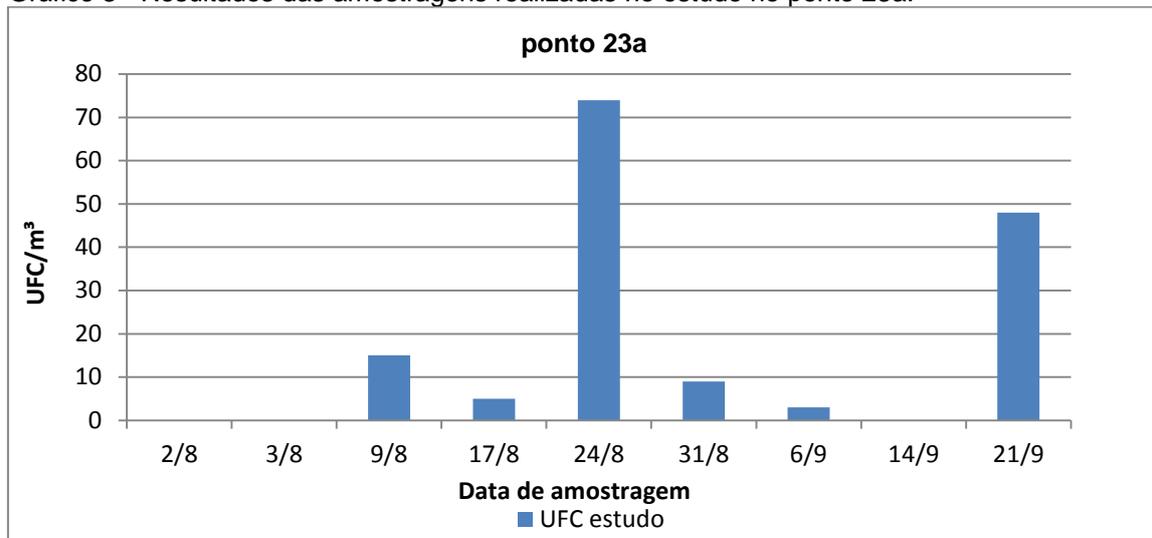
A amostragem no ponto 22a foi realizada somente no estudo do período de 14/06/2016 à 24/08/2016. Esse ponto não fazia parte da rotina no monitoramento da área limpa, porém, foi decidido amostrá-lo por ser um ponto de alto fluxo de pessoas e materiais e, a partir do dia 31/08, a empresa iniciou a amostragem desse ponto, sendo realizada junto com a amostragem realizada no estudo. Devido aos poucos resultados obtidos pela empresa, não foi possível realizar o tratamento estatístico para comparação dos resultados nesse ponto.

Foi observada a prevalência de fungos no ponto 22a amostrado no estudo e, a partir do dia 31/08 (data que a empresa inicia a amostragem desse ponto), também pela empresa. A presença de fungos pode estar relacionada à proximidade desse ponto a portas e *pass-throughs* e a maior quantidade de materiais e fluxo de pessoas na sala, já que a mesma estava sendo utilizada para a manipulação de medicamentos de suporte e medicamentos quimioterápicos.

Outro fato observado foi que embora a sala de manipulação de medicamentos de suporte tenha a partir do dia 31/08, reduzido o número de funcionários e materiais na sala devido à transferência da manipulação dos medicamentos quimioterápicos para a sala de origem (sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos), não foi observada redução no número de contagem de colônias totais nos pontos 17a, 18a, 20a, 21a e 22a, provavelmente devido aos poucos resultados obtidos após essa data.

O gráfico 3 mostra o resultado das amostragens realizadas no ponto 23a.

Gráfico 3 - Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 23a.



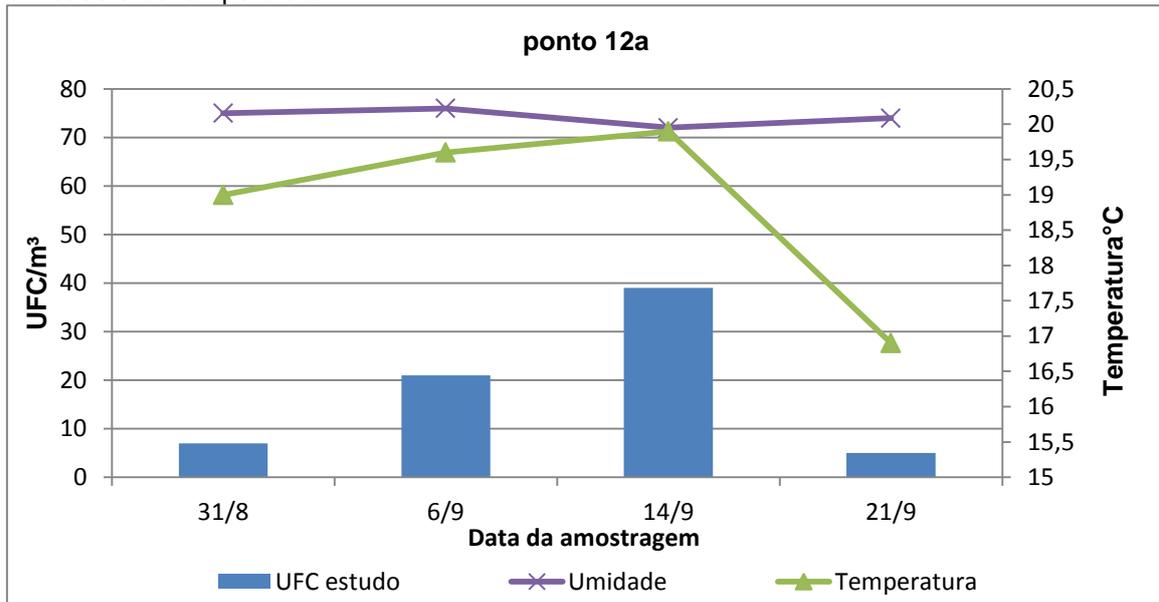
O ponto 23a, antecâmara da sala de manipulação de medicamentos de suporte (Grau C), é um ambiente de baixo fluxo de pessoas e materiais, o que justifica a baixa contagem de colônias obtida nesse ambiente. No dia 21/09/2016 houve um aumento significativo de recuperação de colônias que pode ser explicado pela porta da antecâmara deixada aberta no sentido da área Grau D, por uns 20 segundos, por um funcionário durante o momento da amostragem. Fungo foi o micro-organismo prevalente recuperado nesse ponto.

Após a abertura da sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos em 31/08/2016, a manipulação desses medicamentos foi transferida para a sua sala de origem. Com isso a manipulação de medicamentos quimioterápicos e de suporte ocorreu, cada uma, na sua respectiva sala de manipulação.

Na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos, os pontos 12a, 13a, 14a e 15a foram amostrados no estudo e pela empresa (Anexo A). Esses pontos não passaram por tratamento estatístico devido aos poucos resultados obtidos durante o estudo.

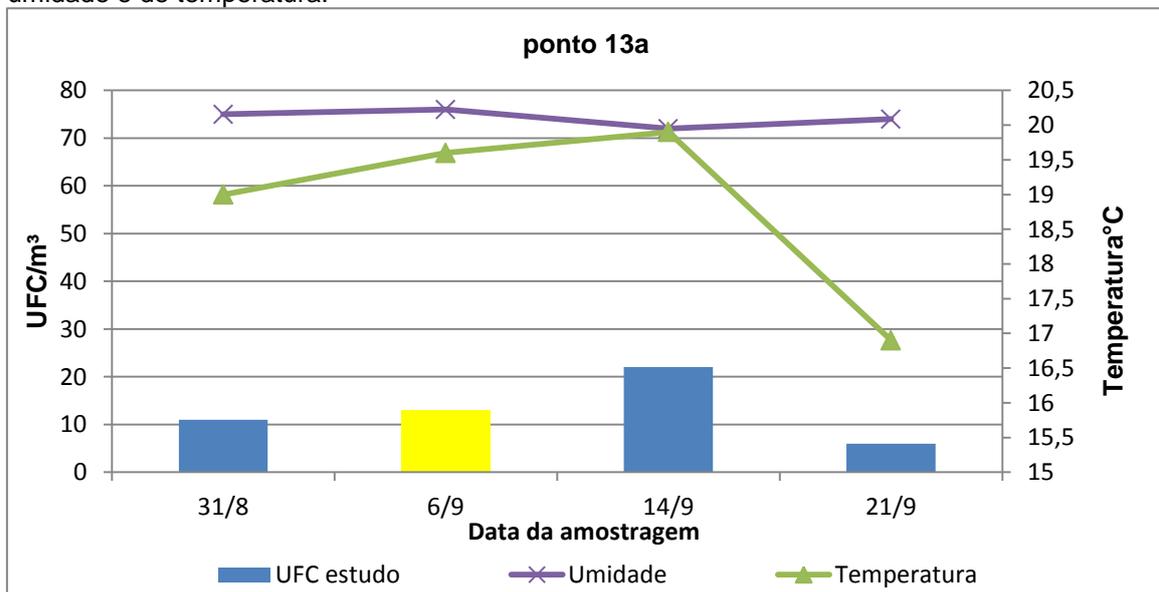
Os gráficos 4, 5 e 6 contêm os resultados das amostragens realizadas no estudo nos pontos 12a, 13a e 15a.

Gráfico 4 - Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 12a e o registro de umidade e de temperatura.



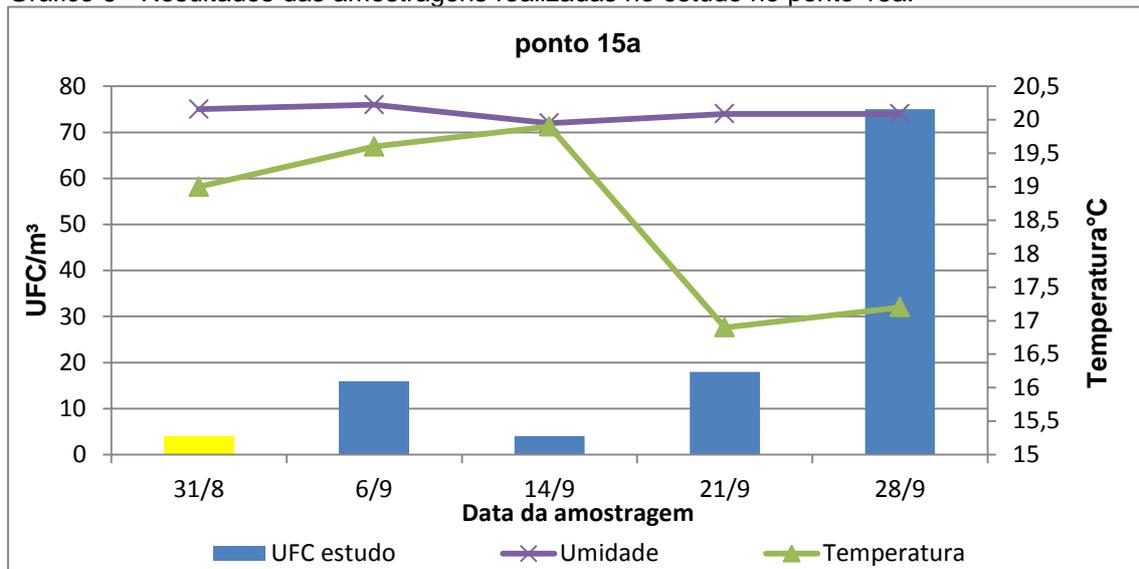
— A escala de umidade é a mesma escala de contagem microbiana (UFC/m<sup>3</sup>).

Gráfico 5 - Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 13a e o registro de umidade e de temperatura.



Legenda: — A escala de umidade é a mesma escala de contagem microbiana (UFC/m<sup>3</sup>).  
■ Resultado com crescimento confluyente na placa do estudo.

Gráfico 6 - Resultados das amostragens realizadas no estudo no ponto 15a.



Legenda: ■ Resultado com crescimento confluyente na placa do estudo.

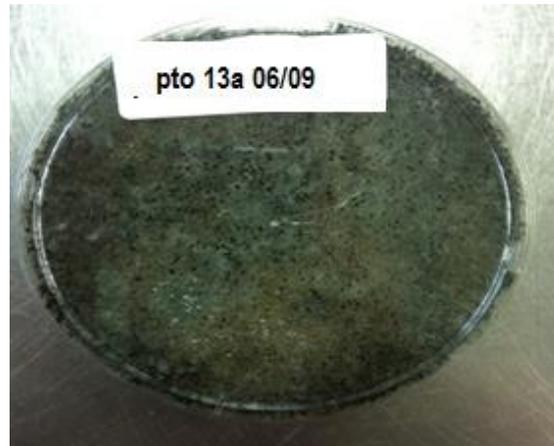
Pelos gráficos 4, 5 e 6 foi possível verificar a associação entre o aumento da temperatura e o aumento do crescimento de micro-organismo na área limpa estudada e, a partir do momento que a temperatura diminui, observou-se diminuição da recuperação da microbiota.

O ponto 14a, assim como o ponto 22a, não era amostrado como rotina no monitoramento da área limpa, porém, nesse estudo foi decidido amostrá-lo por ser um ponto de alto fluxo de pessoas e materiais e, a partir do dia 31/08, a empresa iniciou a amostragem desse ponto, sendo realizada junto com a amostragem no estudo. Assim como os pontos 12a, 13a e 15a, o ponto 14a não pôde ser analisado por métodos estatísticos devido aos poucos resultados obtidos durante o estudo.

O ponto 11a, interior da CSB (Grau A) não mostrou nenhum crescimento de colônias, conforme esperado para um ambiente com essa classificação (ANVISA, 2013, EUROPEAN COMMISSION, 2008). Os pontos 8a, 9a e 10a, não foram amostrados devido a não utilização da CSB 3 na manipulação durante o período do estudo.

A figura 3 mostra um resultado do estudo com crescimento confluyente na placa com meio de cultura SBD.

Figura 3 - Placa com meio SBD amostrada no estudo com crescimento confluyente (referente ao ponto 13a).



A partir da análise dos dados do estudo foi possível verificar uma maior recuperação de colônias (média de 39 UFC) em pontos próximos a portas e a *pass-throughs* da sala de manipulação de medicamentos de suporte e quimioterápicos (pontos 14a, 17a, 18a e 22a). Já em pontos mais distantes das portas e *pass-throughs* há uma tendência de menor crescimento microbiano, média de 18 UFC (pontos 12a, 13a, 20a e 21a).

Os pontos amostrados nas antecâmaras tendem a ter um baixo crescimento de colônias, devido à baixa circulação de pessoas. Foi possível identificar no gráfico 3 (ponto 23 da sala de manipulação de medicamentos de suporte), que a conduta errada de uma funcionária, ao deixar a porta aberta no sentido de uma área de menor classificação, refletiu em alto crescimento de colônias nas placas.

A partir do somatório de colônias de bactéria e fungos recuperadas no estudo por amostragem ativa nos pontos 12a, 13a, 14a, 15a, 17a, 18a, 20a, 21a, 22a e 23a (Tabela 3), foi verificada a prevalência de fungos na área limpa estudada. Esse resultado pode ser justificado pela alta quantidade de material nas salas, como embalagens de papel e plástico, utilizados na manipulação e pelo descontrole da temperatura e principalmente da umidade na área limpa. Embora durante a amostragem da sala de manipulação de medicamentos de suporte não tenha sido registrada a umidade, o registro histórico da sala mostra uma variação de umidade entre 65-70%. Na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos a média da temperatura, durante o estudo, foi 17,8°C e da umidade 73,4% e, na sala de nutrição parenteral a média da temperatura foi de 17°C e da umidade 75,8%.

Tabela 3 – Somatório de colônias de bactérias e fungos nas amostragens realizadas no estudo

Amostragem	Somatório da recuperação (UFC)	
	Bactéria	Fungo
Estudo	929	1652

#### 4.2.2 Amostragem passiva do ar

Conforme o Guia de qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica publicado pela Anvisa (2013) e o Guia de boas práticas de produção Europeia (EU GMP), a amostragem passiva de ar deve ser realizada durante todo o período de produção a fim de avaliar a qualidade microbiológica do ambiente (ANVISA, 2013, EUROPEAN COMMISSION, 2008).

Como esse método de amostragem não era empregado na rotina de monitoramento da área limpa pela empresa contratada, foi decidido realizá-lo no estudo em um dos turnos de manipulação.

Foi realizada a amostragem do ar pelo método passivo no interior da CSB 7, nas salas de manipulação de nutrição parenteral e de medicamentos de suporte durante o processo de manipulação.

A amostragem realizada no interior da CSB 7 (Grau A) da sala de manipulação de medicamentos de suporte, foi negativa (zero UFC/4 horas) nas 13 amostragens realizadas no estudo. Esse resultado condiz com os resultados esperados em áreas com alto rigor no número de partículas e fluxo de ar, como em uma área Grau A (ANVISA, 2013, EUROPEAN COMMISSION, 2008).

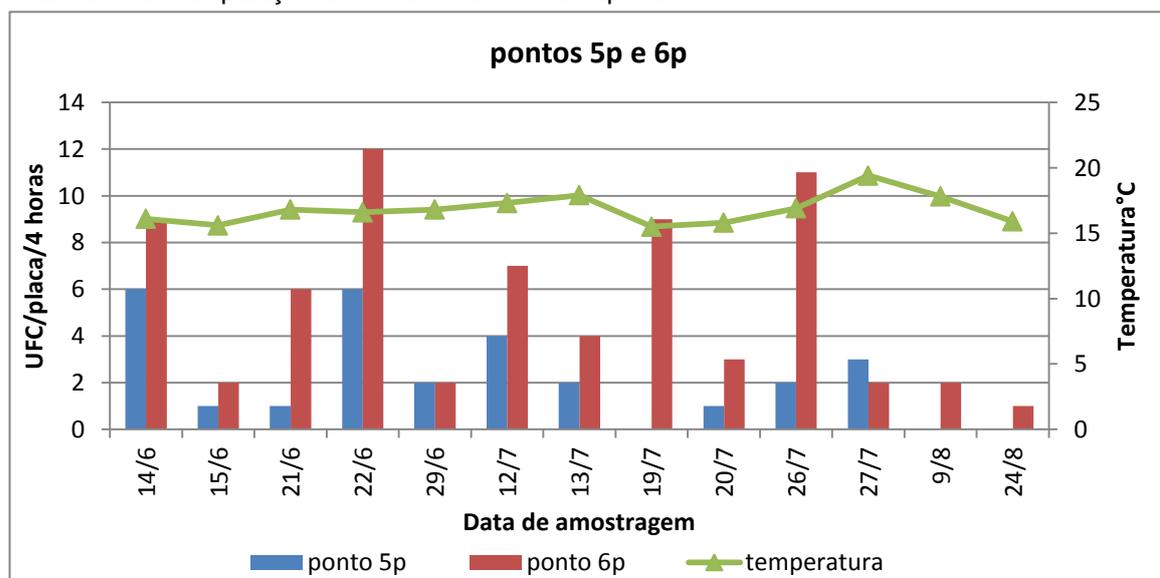
Das 27 amostragens obtidas na sala de manipulação de nutrição parenteral (Grau C), houve apenas 1 resultado (3,7%), ponto 1p, com crescimento de colônia (1 UFC/4 horas). Esse resultado baixo pode ser explicado pela excelente limpeza e desinfecção realizada na área antes da realização da amostragem, ao alto rigor das condutas assépticas realizadas pelos manipuladores, ao baixo fluxo de materiais e pessoas na sala de manipulação e o pequeno número de bolsas preparadas por dia

(máximo de 10 bolsas por dia). Os pontos de amostragem pelo método passivo estão identificados no Anexo B.

Foi realizada a comparação dos resultados de dois métodos de amostragem de ar (ativo e passivo), em um mesmo local, na sala de manipulação de medicamentos de suporte (ambiente Grau C) próximo à porta e ao *pass-through*, com alto fluxo de pessoas e materiais. Esse local contempla o ponto 22a do Anexo A e o ponto 7p do Anexo B. O resultado estatístico dessa comparação obteve um p-valor de  $2,66 \times 10^{-15}$ , mostrando que o método de amostragem ativa apresenta resultados significativamente maiores quando comparado com a amostragem passiva.

O gráfico 7 mostra a comparação dos resultados da amostragem passiva realizada em dois pontos na sala de manipulação de medicamentos de suporte (pontos 5p e 6p – Anexo B). O objetivo dessa comparação foi verificar se o ponto de amostragem próximo ao fluxo de pessoas e materiais influência na maior recuperação de micro-organismos quando comparado a outro ponto com menor fluxo.

Gráfico 7 – Comparação da recuperação de colônias pela amostragem passiva no ponto 5p e 6p da sala de manipulação de medicamentos de suporte.



No gráfico 7 podemos observar redução na recuperação de micro-organismos pelo método passivo nos dois pontos amostrados e, ainda, resultados negativos

(zero UFC/placa) no ponto 5p. Essa baixa recuperação pode ser explicada pela limitação do método quanto à dependência da ação da gravidade e tamanho da partícula. Em áreas dinâmicas com alto fluxo de ar, tanto turbulento quanto unidirecional, as partículas tendem a seguir o fluxo de ar e não se depositarem sobre as placas (ANDON, 2006, GEBALA; SANDLE, 2013). Para ocorrer a sedimentação de partículas, geralmente as de maior diâmetro, tem que vencer o fluxo de ar para se depositarem (JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011, SANDLE, 2015).

O resultado estatístico da comparação desses dois pontos mostrou um p-valor de 0,001577, indicando que a média de recuperação do ponto 6p foi superior ao ponto 5p ( $\alpha = 0,05$ , teste unilateral à direita). Esse resultado pode ser justificado pelo ponto 6p estar localizado em um ambiente de maior circulação de pessoas e materiais do que o ponto 5p.

Conforme Andon (2006), em áreas Grau A, onde as partículas tendem a ser de pequeno diâmetro e o fluxo de ar alto, esse método pode ter baixa eficiência, não sendo capaz de recuperar a verdadeira biocontaminação presente no ambiente. E à medida que o grau de classificação da área torna-se menos rigoroso, é previsto um aumento na recuperação dos micro-organismos nas placas. Porém, em áreas limpas modernas, bem controladas e com o emprego de novas tecnologias em vestuário e materiais, é esperada uma menor quantidade de partículas de grandes diâmetros suspensas no ar e conseqüentemente, uma menor recuperação por esse método.

Conforme o Guia do FDA GMP (2004) e Sandle (2015), o método por amostragem passiva não deve ser utilizado de forma isolada em um plano de monitoramento ambiental. O não crescimento de colônias em placas de amostragem por esse método não indica um ambiente livre de contaminação e sim a impossibilidade desses contaminantes se depositarem sobre as placas (ANDON, 2006, FDA, 2004, ISO, 2003, JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011). Logo, o uso isolado não é recomendado por ser um método que pode gerar uma sensação falsa de segurança e de ambiente com baixo risco de contaminação (ANDON, 2006).

A Farmacopeia Americana não descreve o uso desse método, porém o Guia da Anvisa (ANVISA, 2013), Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA..., 2010), Guia de boas práticas de fabricação da Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2008) e da OMS (WHO, 2011), recomendam a sua realização sempre associada ao método ativo.

A justificativa para o emprego desse método por esses guias é que embora esse método tenha limitações quantitativas, é considerado um indicador de práticas assépticas durante todo o período de produção, diferente do método ativo, que amostra o ar por um determinado período, deixando descoberto um período da produção. Portanto, mesmo com as limitações do método, este foi considerado fundamental em um plano de monitoramento a fim de se adequar às exigências da legislação nacional, além de ser um método de baixo custo, não invasivo e o único disponível para o monitoramento contínuo de partículas viáveis durante todo o processo de manipulação. Porém, considera-se importante um estudo amplo para a avaliação do método de amostragem passiva a fim de fundamentar a real obrigatoriedade de tal método pela legislação nacional.

A prevalência de fungos em diversos pontos amostrados na área limpa do estudo diverge dos dados encontrados na literatura. Diversas publicações descrevem a prevalência bacteriana na microbiota de uma área limpa para fins farmacêuticos, bem como descrevem a microbiota bacteriana humana como a mais importante fonte de contaminação (FAVERO et al, 1966, HALLS, 2003, PACHECO; PINTO, 2010, PARK et al, 2013, SANDLE, 2011, WU, 2007).

Porém, segundo Vijayakumar, Sandle e Manoharan (2012), a porcentagem de *recall* de produtos contaminados por fungos e leveduras aumentou de 5% para 21% em 12 anos. Além disso, esse estudo destaca que a contaminação fúngica e o seu risco são subestimados pelas empresas farmacêuticas. Historicamente, há um maior interesse na identificação de bactérias em área limpas, e os poucos estudos sobre a microbiota fúngica mostram que os gêneros mais prevalentes são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichophyton* spp. (SANDLE, 2011, VIJAYAKUMAR; SANDLE; MANOHARAN, 2012); LOPOLITO; BARTNETT; POLARINE, 2007), *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. e *Curvularia* spp. (VIJAYAKUMAR; SANDLE; MANOHARAN, 2012).

Em 2012, a contaminação fúngica de um produto farmacêutico para uso injetável manipulado em uma farmácia de manipulação nos Estados Unidos resultou na morte de 61 pessoas (SMITH et al, 2013), sendo considerado o caso mais grave já existente. A contaminação do lote do produto foi predominantemente pela espécie *Exserohilum rostratum* cuja infecção é considerada de difícil tratamento por apresentar resistência a vários antifúngicos. Essa espécie apresenta baixa identificação em áreas limpas e pertence ao grupo dos Dematiáceos, cuja

resistência aos agentes físicos e químicos empregados na limpeza e desinfecção da área é maior quando comparado aos outros fungos frequentemente encontrados nesses ambientes (fungos hialinos). A razão para esse incidente foi relacionada às falhas na garantia da esterilidade (uso inadequado da autoclave) e deficiências em práticas assépticas, como limpeza e desinfecção (VIJAYAKUMAR; AL-ABOODY; SANDLE, 2015).

A baixa identificação de fungos em áreas limpas pode ser explicada por falhas no processo de monitoramento, desde a escolha do meio de cultura não específico para a recuperação de fungos, condições de incubação que favoreçam o crescimento principalmente de bactérias, até ao laboratório de microbiologia, em que muitos não possuem tecnologia, materiais, métodos ou pessoal qualificado em micologia para a sua identificação (GEBALA; SANDLE, 2013). O uso de um meio não específico para a recuperação da microbiota da área limpa é defendido não só pela economia de recursos, mas principalmente pela menor intervenção realizada na área de trabalho durante as atividades de amostragem. A ordem de incubação dos meios inespecíficos em dois regimes de temperatura ainda é um ponto muito discutido devido às vantagens e desvantagens de cada regime no favorecimento da recuperação de bactérias e fungos (GORDON, 2014, SANDLE, 2014a). Embora diretrizes da Anvisa (2013) e do FDA (2004) recomendem a validação da ordem de incubação a fim de favorecer a recuperação da maioria das bactérias e fungos presentes na área limpa, a Farmacopeia Americana, no capítulo <1116>, sugere a escolha do regime que favoreça a recuperação de bactérias já que são considerados os micro-organismos prevalentes em uma área limpa.

A partir do aumento das incidências de contaminação fúngica e as limitações técnicas dos métodos de monitoramento ambiental, agências regulatórias que antes valorizavam o monitoramento de micro-organismos mesofílicos, passaram a orientar a reavaliação do programa de monitoramento ambiental pelas indústrias quanto a identificação de micro-organismos específicos como fungos e psicofílicos\* (GEBALA; SANDLE, 2013).

A contaminação fúngica em áreas limpas sempre foi associada a problemas de estrutura e de processos. Foi verificada a colonização desses micro-organismos em diversos locais da unidade de tratamento do ar do sistema HVAC, como

---

\*Micro-organismos psicofílicos – são organismos extremófilos capazes de se desenvolverem e reproduzirem em baixas temperaturas (menor que 15°C).

ventiladores, dutos (WILSON et al, 2007) e filtros absolutos (SIMMONS; CROW, 1995). Problemas no desempenho do sistema de filtragem como renovação ineficiente do ar, deficiência na pressurização e conseqüentemente, fluxo de ar inadequado, temperatura e umidade descontroladas (VIJAYAKUMAR; SANDLE; MANOHARAN, 2012) e filtros absolutos danificados e umedecidos são fatores que favorecem a proliferação desses micro-organismos (SIMMONS; CROW, 1995). Outro fator consiste no estado de conservação da infraestrutura da área limpa. Problemas com pisos, paredes, rodapés, tetos, presença de rachaduras nos acabamentos e vibrações de construções podem favorecer a proliferação de fungos. Além disso, os materiais empregados na construção da área limpa (tintas, placas de gesso, cola, *drywall*) são capazes de absorver a umidade e podem ainda, quando não tratados com fungistáticos, serem fontes nutricionais para o crescimento de fungo (ABRAHAM, 2013, ANDERSEN et al, 2011, SANDLE, 2014b).

A introdução desses micro-organismos na área limpa geralmente é realizada através da transferência de materiais contaminados como, por exemplo, matéria prima principalmente de origem vegetal e materiais embalados em caixa de papelão empoeirados, podendo este inclusive ser uma grande fonte de esporos de fungos (*Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*) e de bactérias (*Bacilos spp.* e *Micrococcus spp.*) (VIJAYAKUMAR; SANDLE; MANOHARAN, 2012). Outra fonte de contaminação fúngica em uma área limpa, porém não muito abordada nos artigos, está relacionada à contaminação fúngica pela microbiota da pele humana. Um estudo publicado por Findley et al (2013) mostrou que algumas regiões do corpo humano de adultos saudáveis, como cabeça (porção interna e externa da orelha, parte posterior do couro cabeludo, parte central entre as sobrancelhas e parte interna das narinas), parte superior das costas, peito central superior, cotovelo interno, antebraço médio, região hipotênar da palma da mão, parte inferior do calcanhar, unha e dedos dos pés apresentam na sua microbiota, fungos, principalmente do gênero *Malassezia*, seguidos por *Penicillium* e *Aspergillus*. Além disso, diversos fungos dermatófitos tais como das espécies *Epidermophyton*, *Microsporion* e *Trichophyton* podem estar presentes (VIJAYAKUMAR; SANDLE; MANOHARAN, 2012), podendo a contaminação fúngica proveniente da fonte humana ser maior do que se esperava (SANDLE, 2014b).

Segundo Sandle (2014b), esses fatores associados a práticas de limpeza, desinfecção e processos assépticos deficientes, paramentação inadequada com

exposição de partes da pele e cabelo, fluxo errado de materiais e pessoas devido a processos não bem estabelecidos e validados corroboram para a transferência e permanência desse contaminante no ambiente de produção e sua disseminação na área com risco de contaminação para o produto. Logo, o rigor nas condutas e práticas assépticas executadas pelos funcionários é fundamental para evitar a introdução e a proliferação dos micro-organismos nesses ambientes. No entanto, após a introdução é necessária a eliminação ou redução dessa biocontaminação. Dessa forma, a limpeza e a desinfecção química tornam-se ferramentas vitais em um programa de monitoramento ambiental (LOPOLITO; BARTNETT; POLARINE, 2007).

O conhecimento da microbiota da área limpa permite determinar os agentes químicos mais eficazes contra esses micro-organismos (LOPOLITO; BARTNETT; POLARINE, 2007, SANDLE et al, 2014b). No entanto, muitos programas de limpeza e desinfecção falham devido ao uso desses agentes de forma inapropriada (DIAZ et al, 2014).

O sucesso do processo de limpeza e desinfecção perpassa pelo conhecimento das espécies da microbiota da área limpa, na escolha dos agentes adequados a serem utilizados, pelo treinamento dos funcionários na sua aplicação e validação da capacidade do desinfetante em demonstrar ação bactericida, fungicida, virucida ou esporocida para controlar a contaminação microbiana na área (LOPOLITO; BARTNETT; POLARINE, 2007, SANDLE, 2014c, SHINTANI, 2015a). A validação permite avaliar a concentração ideal, tempo de contato, pH e dureza da água a fim de garantir maior eficácia do agente desinfetante, porém considera-se fundamental a aplicação em condições práticas a fim de avaliar a ação do desinfetante frente a fatores variáveis que podem influenciar a ação desses agentes, como tipo de superfície, presença de matéria orgânica, temperatura e carga biológica (LOPOLITO; BARTNETT; POLARINE, 2007, SANDLE, 2014c, SHINTANI, 2015a). Essa fase é importante na validação a fim de determinar se a técnica e a frequência da limpeza precisam ser ajustadas a fim de um melhor resultado (SANDLE, 2014c).

O guia PDA (2014), Sandle et al (2014b), FDA (2004) e a USP (2016a), descreveram a importância do rodizio entre esporocidas e desinfetantes com mecanismos de ação diferentes e de largo espectro na rotina de limpeza e desinfecção da área limpa. Os agentes esporocidas são corrosivos em aços

inoxidáveis e em plásticos e podem ser perigosos para a saúde do funcionário (SHINTANI, 2015a, USP, 2016a). O uso deve ser seletivo e limitado a ações corretivas ou como alternativa em um programa de rodizio de desinfetantes (SHINTANI, 2015a) a fim de evitar a resistência adquirida dos micro-organismos (SANDLE et al, 2014b)

A presença de esporos bacterianos e fúngicos é um risco para as áreas de produção de medicamentos. Uma área limpa com bom desempenho do sistema HVAC, da infraestrutura e dos processos operacionais é considerada um ambiente inóspito para a proliferação de micro-organismos. Porém, a presença de micro-organismos capazes de formar esporos, permite que estes sobrevivam nesses ambientes. A partir do momento em que as condições tornam-se favoráveis, o esporo absorve água, germina e se transforma em uma célula vegetativa. Os esporos bacterianos e fúngicos são carregados no ambiente por vias diferentes. Os esporos bacterianos são imóveis e geralmente estão aderidos às superfícies, sendo carregados através de práticas operacionais, já os esporos fúngicos são transportados pelo fluxo de ar e gotas de água, podendo ser disseminados a longas distancias (SANDLE, 2016).

Na área limpa do estudo, alguns fatores podem favorecer o resultado aumentado de fungos. A limpeza e desinfecção da infraestrutura da área (teto, parede e chão) são realizadas com desinfetante de amplo espectro diariamente à base de monopersulfato de potássio a 1%, cujo preparo é feito por uma equipe de outro setor do hospital, não havendo, portanto o acompanhamento direto da farmácia na diluição deste agente. Para o controle microbiológico são coletadas, pela empresa contratada, amostras do agente utilizado duas vezes por semana. Para a limpeza e desinfecção das superfícies dos equipamentos e mobiliários são utilizados clorexidina degermante a 2% como detergente, água para injetáveis e álcool a 70% não estéril. Esses agentes não requerem nenhum preparo prévio para o uso, a rastreabilidade diária dos lotes utilizados e o controle microbiológico a cada troca de lote são feitos. A resolução RDC Nº 17/2010 que dispõe sobre as Boas práticas de fabricação de medicamentos em nível industrial, determina que os agentes desinfetantes empregados em áreas Grau A, sejam estéreis. Porém, a legislação que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias (Resolução RDC Nº 67/2007), não especifica o tipo de agente a ser utilizado para a limpeza e

desinfecção dessas superfícies, mas recomenda a alternância periódica entre agentes desinfetantes. O acompanhamento do processo de preparo dos agentes desinfetantes (modo de preparo e diluente utilizado), o estabelecimento da validade após o preparo a fim de comprovar que o agente se mantém estável e ativo durante o período de armazenamento, bem como a avaliação e adequação do uso dos materiais (mops) utilizados para a limpeza garantem a qualidade e eliminam a possibilidade de uma fonte de contaminação na área (SANDLE, 2014c, SHINTANI, 2015a, USP 2016a).

Outro problema da área limpa em estudo é a falta de controle do sistema de refrigeração e umidade. Os dados históricos mostram que a média desses dois parâmetros é de 19°C e 72%, respectivamente. Diversos estudos mostraram a relação do aumento da temperatura e umidade com a proliferação de micro-organismos, principalmente fungos (WHO, 2009, ANDERSEN et al, 2011, SANDLE, 2011, SANDLE, 2012, PARK et al, 2013).

O controle da microbiota fúngica em uma área limpa não se restringe ao uso de desinfetantes de amplo espectro e esporocidas, é fundamental a redução na introdução desses contaminantes via materiais, paramentação inadequada e manutenção da infraestrutura de forma a não permitir o acúmulo e proliferação de micro-organismos aumentando a eficiência no processo de limpeza e desinfecção. Além disso, é imprescindível o controle de temperatura e umidade a fim de evitar a proliferação desses micro-organismos presentes na área limpa.

#### 4.3 ESTABELECIMENTO DOS LIMITES DE ALERTA E A ELABORAÇÃO DE UM PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

O manual de monitoramento ambiental de uma área limpa de manipulação de medicamentos anticâncer, de suporte e nutrição parenteral proposto neste estudo, encontra-se no Apêndice A (p.122). É importante destacar que para confeccionar este manual foram encontradas algumas dificuldades, haja vista que a legislação nacional que dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Produtos Estéreis (Anexo IV da Resolução RDC Nº 67/2007) exige um programa de monitoramento

ambiental. No entanto, essa legislação não estabelece os ensaios, a frequência e os limites aceitáveis para cada parâmetro avaliado.

Desta forma, as informações para a estruturação do plano de monitoramento ambiental do manual foram baseadas em legislações e diretrizes nacionais, internacionais e livros voltados para o monitoramento ambiental de produção de injetáveis em nível industrial conforme descritos na metodologia.

Um plano de monitoramento ambiental consiste na realização de ensaios para o controle de partículas viáveis e não viáveis em operação, em repouso e após a limpeza e desinfecção da área limpa. No entanto, na área limpa do estudo, só são realizados os ensaios de partículas viáveis em operação nas áreas de manipulação de quimioterapia, medicamentos de suporte, BCG e circulação interna da área limpa. Na área de manipulação de nutrição parenteral, a amostragem é realizada após uma rigorosa limpeza e desinfecção dos mobiliários e dos equipamentos e na ausência de funcionários e atividades. A frequência dos ensaios realizados na área limpa do estudo é duas vezes por semana em cada área de manipulação, circulação interna e nos dois vestiários de entrada da área limpa. O ensaio para controle de partículas totais é realizado uma vez por mês e em média 4 horas após a conclusão das atividades de manipulação, conforme cronograma interno. A proposta do manual foi estabelecer um plano de monitoramento de partícula total e viável em operação, repouso e após a limpeza e desinfecção da área, bem como do diferencial de pressão, da temperatura e da umidade para a área limpa do estudo a fim de permitir um maior controle dos processos, do sistema HVAC e da infraestrutura. No manual foram descritos os procedimentos, a frequência mínima, o momento e as sugestões de locais para a amostragem de partículas viáveis do ar, da luva, do vestuário e das superfícies em operação, em repouso e superfícies após a limpeza e desinfecção da área limpa. Contém também um plano de condutas e investigações no caso do resultado do monitoramento ultrapassar o limite de alerta, o limite máximo (desvio) e na reincidência do desvio.

Uma das principais dificuldades encontradas para a elaboração do plano de monitoramento ambiental foi definir os limites de contaminação microbiológica para cada ensaio diante de diretrizes com limites divergentes, além de estabelecer as condutas para a investigação e ação em caso de exceder o limite de alerta e desvio em algum ensaio. Foi verificado que os limites máximos aceitáveis nas diretrizes dos Estados Unidos (FDA, 2004, USP, 2016c, USP, 2016b) divergem dos limites

recomendados pelas diretrizes da Europa, da OMS, do Japão e do Brasil (EUROPEAN COMMISSION, 2008, WHO, 2011, GUIDANCE..., 2012, ANVISA, 2013), conforme descrito no Quadro 10.

Quadro 10 - Número máximo de partículas viáveis para cada tipo de monitoramento durante o processo de produção.

Tipo de monitoramento	Classificação da área limpa (Grau)	EU GMP; ANVISA (2013); WHO Annex 6	FDA GMP	USP
Amostragem ativa do ar (UFC/m <sup>3</sup> )	A	< 1	1	> 1
	B	10	7	ND
	C	100	10	> 10
	D	200	100	> 100
Amostragem passiva do ar (placa 90 mm) (UFC/4 h)	A	< 1	1	ND
	B	5	3	ND
	C	50	5	ND
	D	100	50	ND
Placas de contato (placa de 55 mm) (UFC/placa)	A	< 1	ND	> 3
	B	5	ND	ND
	C	25	ND	> 5
	D	50	ND	> 100
Teste de contato das luvas (5 dedos) (UFC/luva)	A	< 1	ND	> 3
	B	5	ND	ND
	C	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND

Quadro adaptado pela autora a partir das referências FDA (2004), USP (2016c), EUROPEAN COMMISSION (2008), WHO (2011) e ANVISA (2013).

\*Amostras de áreas Grau A deveriam normalmente não ter nenhum contaminante microbiológico.

A partir dos dados descritos no Quadro 10 foi possível comparar os limites de contaminação das diferentes diretrizes e observar a ocorrência de discrepâncias entre elas. No caso de amostragem ativa do ar em ambiente Grau A, a Farmacopeia Americana sugere o limite para desencadear ações acima de 1 UFC, logo o entendimento é que o crescimento de 1 colônia nesse ambiente é aceitável enquanto nas demais, com esse resultado já há a necessidade de uma ação imediata. Já em uma área Grau C, a Farmacopeia Americana estabelece o limite de ação acima de 10 UFC, e as demais acima de 100 UFC. Em relação às amostragens de superfícies e das luvas do manipulador, a Farmacopeia Americana permite, em área Grau A, até 3 UFC/placa e as outras diretrizes, mais rigorosas, não permitem nenhum crescimento microbiano. Foi observada uma contradição dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Americana, sendo mais permissiva em ambiente Grau A, por exemplo, na luva do manipulador, e mais rigorosa em um ambiente

Grau C (amostragem ativa do ar) quando comparada as outras diretrizes. Considerando que a manipulação de injetáveis ocorre por processo asséptico em um ambiente Grau A, que são preparações extemporâneas e não passam pela etapa de esterilização terminal e nem por testes de esterilidade, é importante que haja um maior rigor dos processos realizados nesse ambiente a fim de preservar a esterilidade do produto até o momento da administração (GUDEMAN et al, 2013, MYERS, 2013, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Embora a Farmacopeia Americana seja uma referência voltada para a manipulação de medicamentos, ou seja, mais próxima da realidade de um serviço magistral, foi decidido para a elaboração do manual, a utilização dos parâmetros estabelecidos no Guia de Boas Práticas de Fabricação da Europa e seguidos pela RDC N°17/2010, pelo fato da legislação nacional ser mais rigorosa em ambientes considerados críticos, principalmente com relação à contaminação em superfícies, que está intimamente relacionada a práticas de limpeza, desinfecção e condutas dos funcionários na prática asséptica, e menos rigorosa em ambientes adjacentes como em área Grau C.

Apesar da amostragem das luvas dos funcionários em ambiente Grau C não estar descrita nos guias de monitoramento para a indústria farmacêutica, esse ensaio foi incluído no plano de monitoramento ambiental da área limpa em estudo, uma vez que a área Grau C é o ambiente mais próximo à área Grau A, conforme exigência da Resolução RDC N°67/2007, e o funcionário de suporte estar diretamente em contato com os materiais (estéreis e não estéreis) que são introduzidos na CSB ou EFU (Grau A). Desta forma, o risco de carreamento de contaminantes provenientes desses materiais para o interior do ambiente Grau A, através das mãos dos funcionários, é alto, principalmente quando práticas assépticas e de limpeza e desinfecção desses materiais são mal conduzidas (SANDLE, 2014b). Portanto, esse tipo de ensaio pode contribuir para o aprimoramento contínuo de condutas e processos. Porém, por não estar descrito nos guias de monitoramento, não há o limite aceitável especificado. Logo, o limite de contaminação utilizado como referência para esse tipo de amostragem foi o estabelecido no capítulo <1116> da Farmacopeia Americana de 2011, o qual não é mais descrito na versão de 2016.

Em relação à frequência de amostragem de partículas totais e viáveis, foi utilizada a orientação do Guia da Anvisa de 2013 (Quadro 11).

Quadro 11 - Frequência de amostragem de partículas totais e viáveis sugerida pela Anvisa .

<b>Classificação da área</b>	<b>Partícula total</b>	<b>Ativa do ar</b>	<b>Passiva do ar</b>	<b>Superfície</b>	<b>Luva</b>
<b>Grau A</b>	Todo o período de produção	Uma vez por turno	Todo o período de produção	Uma vez por turno	Uma vez por turno
<b>Grau B</b>	Quando houver produção	Diária	Diária	Diária	Diária
<b>Grau C</b>	Semanal	Semanal	Semanal	Semanal	NR
<b>Grau D</b>	NR	Mensal	Mensal	NR	NR
<b>EFU em área Grau B</b>	Quando houver produção	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno	Uma vez por turno
<b>EFU em área Grau C</b>	Semanal	Semanal	Semanal	Semanal	Semanal
<b>EFU em área Grau D</b>	Mensal	Mensal	Mensal	Mensal	Mensal

NR - Não Requerido

EFU – Equipamento de fluxo Unidirecional

fonte: adaptada pela autora a partir de ANVISA (2013).

Em relação à frequência mínima de realização dos ensaios para o monitoramento ambiental é estabelecida pela Anvisa (2013) a amostragem semanal de partículas totais e viáveis do ar, das superfícies e das luvas tanto em ambientes Grau C, como naqueles com EFU circundados por ambientes Grau C. Já em ambientes com EFU circundados por ambientes Grau D e em ambientes Grau D, a frequência mínima exigida é mensal. Para o manual foi determinada a amostragem semanal para todas as salas de manipulação (nutrição parenteral, medicamentos de suporte, quimioterapia e BCG) independente do grau de classificação (Grau C e D). Embora a Anvisa (2013) não especifique se a amostragem deve ser realizada em um turno de manipulação ou durante todo processo de produção, ficou estabelecido no manual que a amostragem deve ser realizada a cada turno de manipulação, a fim de que toda a equipe do dia envolvida no processo seja avaliada.

O monitoramento de partículas viáveis realizado atualmente na área limpa do estudo é feito duas vezes por semana nas áreas de manipulação de nutrição parenteral, de medicamentos de suporte e de quimioterapia, e uma vez por semana na área de manipulação de BCG. Contudo, foi estabelecida no manual a frequência mínima de realização do monitoramento, uma vez por semana, conforme a orientação da legislação (ANVISA, 2013), apenas como informação, não havendo nenhum empecilho em monitorar as salas com maior frequência, ficando a critério do estabelecimento. Embora a amostragem de superfícies em áreas Grau D não seja

requerida, foi estabelecida a amostragem na sala de manipulação de BCG (ambiente Grau D) devido à proximidade à CSB.

A amostragem passiva ou por sedimentação foi incluída no plano de monitoramento ambiental a fim de atender as exigências da legislação nacional (ANVISA, 2013) que segue as diretrizes da Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2008) e da OMS (WHO, 2012). O guia da Anvisa (2013) exige a amostragem passiva em todos os ambientes de produção, variando apenas a frequência de amostragem de acordo com a classificação da área. Em ambientes mais críticos (Grau A e B), esse tipo de amostragem deve ser feito durante todo o processo produtivo, já em ambientes com baixo risco de contaminação para o produto, a amostragem deve ser semanal ou até mensal (Grau C e D). As diretrizes americanas (FDA, 2004, USP, 2016b) não exigem o uso desse método de amostragem. O guia do FDA (2004) descreve como opcional, porém, devido ao resultado semi-quantitativo ou qualitativo desse método, não deve ser empregado de forma isolada e sim associado a outros métodos de amostragem. As divergências de opiniões também se estendem em vários artigos publicados por Andon, (2006), Pasquarella, Pitzurra e Savino (2000) e Sandle (2015). Contudo esse método foi considerado na elaboração do plano de monitoramento para se adequar às exigências da legislação nacional (FARMACOPEIA..., 2010, ANVISA, 2013).

Durante a elaboração do manual foi observado que para a execução de um plano de monitoramento ambiental de produção asséptica robusto, é fundamental que alguns requisitos de qualidade estejam estabelecidos. Deve haver controle de todas as etapas e fatores que podem influenciar o resultado do monitoramento como calibrações de equipamentos, validações de processos, protocolos de limpeza e desinfecção e condutas, programa de treinamento e qualificação dos funcionários e do sistema HVAC (SHINTANI, 2015b). Os medicamentos injetáveis manipulados em farmácias magistrais são formulações únicas com o objetivo de atender às necessidades específicas de um paciente e, preparações extemporâneas, o que inviabiliza o controle de qualidade do produto final. Logo é imprescindível que as etapas de produção estejam bem estruturadas e sejam monitoradas a fim de assegurar a qualidade do produto final (GUDEMAN et al, 2013; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; RODRIGUES, 2010). Essas ações fazem parte da garantia da qualidade que é uma ferramenta da Gestão da Qualidade e exige conhecimento, equipe multidisciplinar, equipamentos, investimento e treinamento, o que dificulta a

execução em farmácias de manipulação (BONFILIO et al, 2010, RODRIGUES, 2010). No entanto, os requisitos de qualidade (calibrações de equipamentos, treinamento dos funcionários, procedimentos das condutas descritos, validação de processos e certificados de qualidade dos materiais empregados) foram incluídos no manual como pré-requisitos para o estabelecimento de um plano de monitoramento ambiental para uma área limpa por entender que as melhorias dos processos de qualidade devem ser planejadas e estimuladas.

Para a elaboração do manual foi estabelecido somente o limite de alerta. O limite de ação foi considerado o mesmo valor do limite máximo especificado pelas agências regulatórias. Isso foi decidido a fim de permitir, inicialmente, que as ações estabelecidas no manual sejam melhor consolidadas na área limpa em estudo para posterior definição das condutas e investigações para o limite de ação.

Para estabelecer os limites de alerta dos pontos de amostragem da área limpa foram utilizados os resultados históricos do monitoramento realizado pela empresa. Os limites foram estabelecidos para a amostragem ativa do ar para cada área de manipulação (Grau C). Já para a superfície, como o crescimento de colônias foi baixo em todas as superfícies da área limpa em estudo, estabeleceu-se um valor único para todas as superfícies Grau C. Na área de manipulação de BCG foi estabelecido o limite de alerta do ar e da superfície da sala de manipulação (Grau D). Os limites de alerta calculados estão na tabela 4.

O limite de alerta para a sala de manipulação de medicamentos de suporte não pôde ser estabelecido devido à pequena quantidade de resultados disponíveis para o cálculo, decorrente da não utilização dessa sala por aproximadamente 10 meses devido a um procedimento de manutenção das CSB. A quantidade de resultados obtidos durante o período do estudo também não gerou um valor significativo que fosse representativo para o cálculo do limite de alerta para o ambiente.

Para a sala de manipulação de nutrição parenteral foi decidido estabelecer um limite único para todos os pontos amostrados, pois os resultados obtidos das amostragens foram baixos. Logo, para evitar ações excessivas e desnecessárias foi considerado o maior valor como o limite de alerta para todos os pontos da sala.

Tabela 4 - Limites de alerta de contaminação do ar, por ponto de amostragem (amostragem ativa), e das superfícies da área limpa.

Área de amostragem	Pontos de amostragem	Grau de classificação da área	Limites de alerta	
			Ar (Ativa) (UFC/m <sup>3</sup> )	Superfície (UFC/placa)
Nutrição parenteral	(2a, 3a, 5a, 6a, 7a)	C	20	7
	Antecâmara	C	25	7
Quimioterapia	9a	C	53	7
	10a	C	60	7
	12a	C	35	7
	13a	C	40	7
	14a	C	---	7
	15a	C	25	7
BCG	Centro da sala	D	55	7

--- não havia dados para calcular o limite de alerta.

O limite de alerta para a sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos foi definido para cada ponto de amostragem devido à divergência de resultados encontrados dentro da mesma sala. Os pontos 9a e 10a são próximos à porta e ao *pass-through* de saída de material da sala, com isso o maior fluxo de pessoas e materiais deve favorecer o aumento de contagem de colônias nesses dois pontos quando comparado aos outros pontos da sala.

A decisão de não estabelecer um resultado único para todas as salas de mesma classificação, foi devido à divergência de resultados entre as diferentes salas, como a sala de manipulação de nutrição parenteral e a sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos. A amostragem da sala de nutrição parenteral é feita na ausência de atividades e funcionários, logo o crescimento de colônias nas placas amostradas nessa sala é muito baixo, diferente do que ocorre com a sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos na qual a amostragem é feita em operação e, conseqüentemente, há maior crescimento de colônias nas placas. Logo, estabelecer um resultado para todas as salas, não seria fidedigno e poderia não refletir as tendências de mudanças no crescimento de colônias de um determinado ponto. Alguns limites de alerta não foram estabelecidos devido a não realização do ensaio conforme sugerido no Manual para o plano de monitoramento ambiental

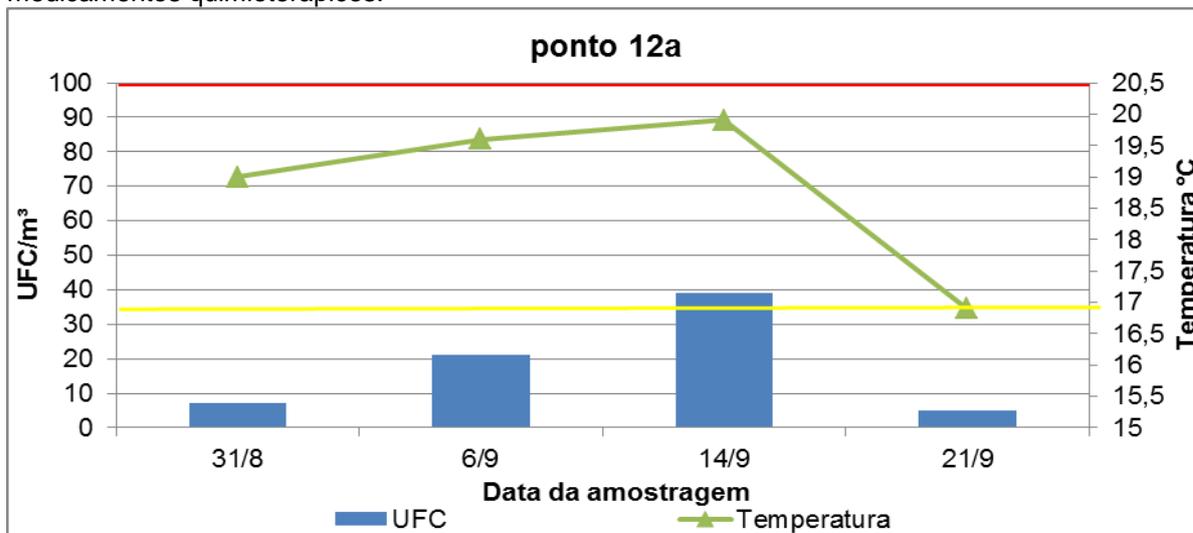
como, superfície após a limpeza e desinfecção, superfície do vestuário, partícula total do ar em operação e em repouso, partículas viáveis do ar por amostragem ativa e passiva em repouso. No entanto, na elaboração do manual, a fim de facilitar a compreensão e, considerando que os limites de alerta para cada área limpa podem variar de acordo com a infraestrutura e as rotinas e condutas estabelecidas por cada serviço, foi calculado um valor único para cada sala de manipulação e não por cada ponto de amostragem, como mostrada na tabela 5.

Tabela 5 - Limites de alerta de contaminação do ar, por sala (amostragem ativa), e das superfícies da área limpa.

Área de amostragem	Pontos de amostragem	Grau de classificação do local de amostragem	Limite de alerta	
			Ar (ativa) (UFC/m <sup>3</sup> )	Superfície (UFC/placa)
Nutrição parenteral	Sala de manipulação	C	20	7
	Antecâmara	C	25	
Quimioterapia	Sala de manipulação	C	45	7
	Antecâmara	C	25	
BCG	Sala de manipulação	D	55	7

A elaboração de gráficos como instrumentos de acompanhamento permite a análise de um conjunto de resultados e não de um único resultado, permitindo a análise de tendência do comportamento do ambiente em torno do ponto amostrado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Portanto, a atualização dos dados e a revisão dos limites devem ser realizadas para que os limites correspondam ao desempenho real do ambiente (ANVISA, 2013, PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). O gráfico 8 mostra, como exemplo, o resultado de um ponto amostrado na área limpa do estudo por um determinado período de tempo com os limites de alerta e máximo estabelecidos (desvio).

Gráfico 8 – Análise de tendência de contaminação de um ponto (12a) na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos.



Legenda: — Limite máximo de colônias permitidas para amostragem ativa em ambiente Grau C (100 UFC/m³).

— Limite de alerta estabelecido pelos dados históricos (35 UFC/m³).

O gráfico 8 mostra uma análise de tendência decorrente do monitoramento em um ponto na sala de manipulação de medicamentos quimioterápicos. A disposição dos resultados em gráfico permite acompanhar a evolução do crescimento de micro-organismos e possibilita a implementação de ações antes que seja alcançado o limite máximo, o que poderia comprometer a qualidade do produto. Pelo gráfico é possível verificar a associação entre o aumento da temperatura e o aumento do crescimento de micro-organismo na área limpa estudada e, a partir do momento que a temperatura diminui, observou-se diminuição da recuperação da microbiota. Exceder o limite de alerta não tem indicação de nenhuma ação corretiva e preventiva, apenas de alertar aos funcionários e revisar condutas e processos. No entanto, extrapolar o limite máximo exige ações imediatas de investigação para descobrir o fator causal e ações corretivas e preventivas para solucionar o problema e evitar recorrência (FARMACOPEIA..., 2010, USP, 2016b). Além disso, conhecer os limites de cada ponto da sala permite identificar resultados divergentes e intensificar as ações e revisões de condutas. Para isso, é fundamental um acompanhamento e registro das condutas dos funcionários durante toda a manipulação e o monitoramento.

As condutas de investigação e ação estabelecidas no Manual foram baseadas em informações dos guias de monitoramento ambiental, principalmente do PDA TR

Nº13 e da ISO (2015b) e da troca de informações com a empresa Bio-manguinhos. As ações de investigação deflagradas em casos de desvio têm o objetivo de determinar uma relação de causa e efeito. As condutas descritas no manual foram baseadas a partir de guias com sugestões de ações para a indústria, logo são diretrizes que devem ser refinadas na prática hospitalar e após essas práticas já bem estabelecidas, considera-se fundamental estabelecer os limites de ação e as suas condutas para cada ponto amostrado.

Os guias de monitoramento ambiental FDA (2004), Anvisa (2013) e PDA TR Nº 13 (2014) sugerem o uso de análise de risco a fim de determinar o número de pontos, locais e frequência de amostragem. Para esse manual não foi realizada uma análise de risco, os pontos amostrados pela empresa foram avaliados quanto ao posicionamento, circulação, proximidade à área crítica e os locais de entrada e saída de materiais e equipamentos de uma área de menor classificação para uma área de maior classificação, conforme sugestão da Farmacopeia Americana (USP, 2016b). A partir dessa análise, os pontos já amostrados pela empresa foram mantidos e incluídos no plano de amostragem um ponto próximo a portas e *pass-throughs*.

A elaboração do manual com o plano de monitoramento ambiental foi realizado como uma proposta de monitoramento para farmácia magistral, através da adaptação de informações e sugestões para o monitoramento em indústrias. O estabelecimento pleno do plano de monitoramento ambiental é um desafio devido às limitações financeiras e operacionais para uma unidade hospitalar. Atualmente, o controle do ambiente da Central de Preparo de injetáveis desse estudo executa de forma parcial o plano de monitoramento ambiental sugerido para as indústrias farmacêuticas.

O conhecimento de todos os requisitos para a realização de um plano de monitoramento robusto promove a busca contínua por melhorias nos processos e adequação dos contratos com as empresas prestadoras de serviços.

## 5 CONCLUSÃO

A partir do acompanhamento das práticas de amostragem de partículas viáveis realizada pela empresa contratada, foi possível identificar pontos de fragilidade dos processos e do controle ambiental da área limpa do estudo.

Ao analisar os dados históricos coletados pela empresa foi estabelecido os limites de alerta para os ambientes Grau A e C (ar e superfícies) das áreas de manipulação.

Em relação à amostragem ativa do ar, não houve diferença significativa na contagem total de colônias nos resultados obtidos no estudo e pela empresa. Ao comparar a eficiência de recuperação fúngica, não foi visto diferença significativa, porém, em relação à recuperação bacteriana houve diferença em três pontos na sala de manipulação de medicamentos de suporte, sendo a recuperação de bactérias no estudo maior do que a obtida pela empresa. Esse resultado pode ser atribuído ao maior tempo de incubação das placas amostradas no estudo em condição que favoreceu o crescimento bacteriano.

A partir do somatório de colônias de bactérias e fungos recuperadas no estudo por amostragem ativa do ar foi observada a prevalência de fungos na área limpa estudada. Esse resultado pode ser justificado pela grande quantidade de materiais nas salas de manipulação, embalados em papel e plástico, além do descontrole da temperatura e principalmente da umidade na área limpa estudada.

Na amostragem passiva, foi verificado menor crescimento de colônias na sala de manipulação de nutrição parenteral. Na sala de manipulação de medicamentos de suporte foi identificada uma maior recuperação de micro-organismos em um determinado ponto da sala, provavelmente relacionada à proximidade desse ponto a portas e *pass-throughs*. Na comparação entre o método de amostragem ativo e passivo do ar, em um mesmo local na sala de manipulação de medicamentos de suporte, o método ativo apresentou recuperação de micro-organismos muito superior ao resultado da amostragem passiva.

Foi elaborado um manual com o plano de monitoramento ambiental com a definição dos ensaios, das frequências, dos momentos e locais de amostragem, bem como o estabelecimento dos limites aceitáveis de contaminação para cada ambiente e condutas quando a contaminação exceder os limites de alerta e máximo. Além

disso, foi possível identificar requisitos importantes que agregam qualidade à execução de um plano de monitoramento ambiental de áreas limpas.

## 6 PERSPECTIVAS

O plano de monitoramento bem estabelecido pode ser empregado como indicador de qualidade permitindo um acompanhamento mais rigoroso do processo de manipulação, avaliação do desempenho dos processos de limpeza e desinfecção, de condutas dos funcionários envolvidos na manipulação e dos funcionários contratados para o monitoramento da área, bem como o estabelecimento e adequação dos procedimentos de amostragem conforme exigência das normas e guias de boas práticas de produção, agregando qualidade ao produto final, segurança aos pacientes, funcionários e ao ambiente de trabalho.

A partir da elaboração do plano de monitoramento ambiental será possível criar procedimentos operacionais padrão (POP) e com isso estabelecer condutas reprodutíveis e controladas de forma a garantir que o monitoramento seja mais seguro e robusto, contribuindo para o fortalecimento do Sistema de Gestão da Qualidade no ambiente hospitalar.

Espera-se que as informações contidas no manual possam ser utilizadas para o estabelecimento de critérios e exigências nas próximas atualizações de contratos com empresas terceirizadas para a realização de amostragens para análise microbiológica.

Por outro lado, ressalta-se a necessidade da agência regulatória brasileira se atentar para a questão da atualização da legislação voltada para farmácia hospitalar, para que estabeleçam diretrizes de orientação aos profissionais quanto à elaboração de um programa de monitoramento ambiental e a sua efetiva implantação.

Desta forma, espera-se que esse trabalho possa ser utilizado como um modelo para as orientações e ações a serem realizadas por outras farmácias de manipulação de injetáveis, inclusive, por empresas terceirizadas prestadoras de serviço, com a proposta de aperfeiçoar o processo de monitoramento ambiental.

## REFERÊNCIAS

ABDOU, O.; PEYTON, T. Industrial clean rooms: architectural engineering considerations. **Int J Archit Eng Technol.**, v. 1, p.37-52, 1995.

ABNT NBR 7256. **Tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS)** – Requisitos para projeto e execução das instalações. 2005.

ABNT NBR ISO 14644 – **Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 3: Método de ensaio.** 2009.

ABRAHAM, Z. Understanding, Preventing, and Remediating Mold in Cleanrooms. **Institute of Validation Technology**, 2013. Disponível em:<  
<http://www.ivtnetwork.com/article/understanding-preventing-and-remediating-mold-cleanrooms>. Acesso em: 10 jan. 2017.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. ASHP guidelines on handling hazardous drugs. **Am J Health-Syst Pharm.**, v. 63, p. 1172-93, 2006.

\_\_\_\_\_. ASHP guidelines on Compounding Sterile Preparations. **Am J Health-Syst Pharm.**, v. 71, p. 145-66, 2011.

ANDERSEN, B. et al. Associations between Fungal Species and Water-Damaged Building Materials. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, n. 12, p. 4180-4188, 2011.

ANDON, B.M. Active Air vs. Passive Air (Settle Plate) Monitoring in Routine Environmental Monitoring Programs. **PDA J Sci and Tech.**, v. 60, n. 6, p. 350-355, 2006.

ANVISA. Guia de qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica. 1 ed. Brasília, DF, mar. 2013. 56p.

\_\_\_\_\_. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 abr. 2010. Disponível em:  
<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html)>. Acesso em: 10 maio 2015.

\_\_\_\_\_. RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 out. 2007. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/res0067\\_08\\_10\\_2007.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/res0067_08_10_2007.html)>. Acesso em: 08 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. RDC nº 220, de 21 de setembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico de funcionamento dos Serviços de Terapia Antineoplásica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a5d8d680474597419facdf3fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+220-2004.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

\_\_\_\_\_. RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Determina a publicação de Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jan. 2003.

BOIANO, J.M.; STEEGE, A. L.; SWEENEY, M.H. Adherence to Safe Handling Guidelines by Health Care Workers Who Administer Antineoplastic Drugs. **J Occup Environ Hyg.**, v. 11, n. 11, p. 728–740, 2014.

BONFILIO, R. et al. Farmácia Magistral: sua importância e seu perfil de qualidade. **Rev. Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 653-664, 2010.

BOZZETTI, F. et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: non-surgical oncology. **Clin Nutr.**, n. 28, p. 445-454, 2009.

BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições de promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de set. 1990. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L8080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm)>. Acesso em: 19 set. 2016.

\_\_\_\_\_. Portaria GM/MS nº 3.523, de 28 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico contendo medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção de sujidades por métodos físicos e manutenção do estado de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a Qualidade do ar de Interiores e prevenção de riscos à saúde dos ocupantes de ambientes climatizados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 ago. 1998.

Disponível em:

[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3523\\_28\\_08\\_1998.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt3523_28_08_1998.html).

Acesso em 24 abr. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretária Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 272, de 8 de abril de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para fixar os requisitos mínimos exigidos para a Terapia de Nutrição Parenteral. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 abr. 1998. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d5fa69004745761c8411d43fbc4c6735/PORTARIA\\_272\\_1988.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d5fa69004745761c8411d43fbc4c6735/PORTARIA_272_1988.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 01 mar. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Institute for Occupational Safety and Health. **NIOSH List of Antineoplastic and Other Hazardous Drugs in Healthcare Settings, 2016**. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/pdf/hazardous-drugs-list\\_2016-161.pdf](https://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/pdf/hazardous-drugs-list_2016-161.pdf)>. Acesso em: 31 ago. 2016.

CHU, C.W. et al. Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. **J Oncol Pharm Practice**, v. 18, n. 1, p. 46-51, 2011.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Resolução nº 565, de 6 de dezembro de 2012. Dá nova redação aos artigos 1º, 2º e 3º da Resolução/CFF nº 288 de 21 de março de 1996. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/565.pdf>>. Acesso em: 23 de mar. de 2015.

COSTA, E. A. Regulação e Vigilância Sanitária para a Proteção da Saúde. In: VIEIRA, F.P.; REDIGUIERI, C.F.; REDIGUIERI, C.F. (Org.). **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2013. p. 21-37.  
CURTIS, C.; SACKS, G.S. Compounding Parenteral Nutrition: Reducing the Risks. **Nutr Clin Pract.**, v. 24, n. 4, p. 441-446, 2009.

DAVIS, J.; MCLAUCHLAN, R.; CONNOR, TH. Exposure to hazardous drugs in Healthcare: An issue that will not go away. **J Oncol Pharm Practice**, v. 17, n. 1, p.9-13, 2011.

DIAZ, B.R. et al. Strategies for the assessment of Disinfection and Cleaning on Biopharmaceutical Cleanroom. **ABER**, v. 2, p.18-27, 2014.

ENSOR, D.S. ISO Technical Committee on Cleanrooms and Associates Controlled Environments Enters Third Decade with New Changes on horizon. **J IEST.**, v. 57, n. 1, p. 29-34, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Guidelines to Good Manufacturing Practice: Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products.** Brussell, 2008. v.4.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FAVERO, M.S. et al. Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. **Appl Microbiol.**, v. 14, n. 4, p.539-551, 1966.

FDA. **Guidance for Industry: Sterile Drug products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice.** September 2004.

FINDLEY, K. et al. Human Skin Fungal Diversity. **Nature**, v. 498, p. 367–370, 2013.

FLEURY-SOUVERAIN, S. et al. Determination of the external contamination and cross-contamination by cytotoxic drugs on the surfaces of vials available on the Swiss Market. **J Oncol Pharm Pract.**, v. 20, n. 2, p. 100-111, 2014.

FRANSMAN, W. et al. A pooled analysis to study trends in exposure to antineoplastic drugs among nurses. **Ann Occup Hyg.**, v. 51, n. 3, p. 231–239, 2007.

GAPP, G.; HOLZKNECHT, P. Risk analyses of sterile production plants: a new and simple, workable approach. **PDA J Sci and Tech.**, v. 65, p. 217-226, 2011.

GEBALA, B.; SANDLE, T. Comparison of different fungal agar for the environmental monitoring of pharmaceutical – Grade Cleanrooms. **PDA J Sci and Tech.**, v. 67, p. 621-633, 2013.

GILBAR, P; RIDGE, A. Dexamethasone prophylaxis for paclitaxel hypersensitivity. **J Oncol Pharm Practice.**, v. 8, p. 81-87, 2002.

GORDON, O.; BERCHTOLD, M.; STAERK, A. Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. **PDA J Sci and Tech.**, v. 68, p. 394-406, 2014.

GUDEMAN, J. et al. Potential risks of pharmacy compounding. **Drugs R D.**, v. 13, p.1-8, 2013.

GUIDANCE on the Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Produced by Terminal Sterilization. Tokyo, 2012. Disponível em: <<https://www.pmda.go.jp/files/000160794.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

HALLS, H. Microbiological Environmental Monitoring. In: \_\_\_\_\_. **Microbiological Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms**. Florida. 2003. Cap. II., p. 23-51.

HAMADANI, M. et al. Management of platinum-based chemotherapy-induced acute nausea and vomiting: is there a superior serotonin receptor antagonist? **J Oncol Pharm Practice.**, v. 13. p. 69-75, 2007.

HERR, H; MORALES, A. History of Bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **J Urol.**, v. 179, n. 1, p. 53-56, 2008.

HICKEY, R. et al. Cancer concepts and principles: primer for the interventional oncologist-Part II. **J Vasc Interv Radiol.**, v. 24, n. 8, p.1167-1188, 2013.

INCA. Ações e Programas. Rio de Janeiro c1996-2017a. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home)>. Acesso em: 18 set. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Estimativa/2016b – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2016.

ISO. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part: 1: Classification of air cleanliness. Dec. 2015a.

\_\_\_\_\_. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part: 1: Classification of air cleanliness. May. 1999.

\_\_\_\_\_. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part 2: Monitoring to provide evidence of cleanroom performance related to air cleanliness by particle concentration. Dec. 2015b.

\_\_\_\_\_. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1. Sep. 2000.

\_\_\_\_\_. **ISO 14698** – Cleanrooms and associated controlled environments – Biocontamination control – Part 1: General principles and methods. Sept. 2003.

JAPANESE PHARMACOPEIA. 16 ed. Tokyo, 2011.p. 2211- 2215.

KRIPPNER, E. Classificação de Áreas Limpas. **Rev Soc Bras Contr Contaminação**, p. 42-45, 2009.

LOPOLITO, P.; BARTNETT, C.; POLARINE, J. **Control Strategies for Fungal Contamination in Cleanrooms**, 2007. Disponível em:  
<<http://www.cemag.us/article/2007/09/control-strategies-fungal-contamination-cleanrooms>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

MAIA, C.; GUILHEM, D. A política de saúde brasileira: principais debates e desafios e interface desses com a Vigilância Sanitária. **Visa em Debate**, v. 3, n. 4, p. 30-38, 2015.

MYERS, C.E. History of sterile compounding in U.S. hospitals: learning from the tragic lessons of the past. **Am J Health-Syst Pharm.**, v. 70, p. 1415-1427, 2013.

OLIVER, J.D. Recent Findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 34, p. 415-425, 2010.

PACHECO, F.L.C.; PINTO, T.J.A. The bacterial diversity of Pharmaceutical clean rooms analyzed by the fatty acid methyl ester technique. **PDA J Sci and Tech.**, v. 64, p. 156-166, 2010.

PARK, H. et al. Bacterial diversity in the indoor air of pharmaceutical environment. **J Appl Microbiol.**, v. 116, p. 718-727, 2013.

PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **J Hosp Infect.**, v. 46, p. 241-256, 2000.

PDA. Technical Report N° 13 (Revised). Fundamentals of an Environmental Monitoring Program. 2014.

PEYTON, T.; ABDU, O. Environmental control concepts for industrial Clean-Room Facilities. **J Archit Eng.**, v. 1, n.1, p 53-63, 1995.

PINTO, T.S. A; KANEKO, T.M; PINTO, A.F. **Controle de Produtos Estéreis: Ênfase nos Processos Assépticos**. In: \_\_\_\_\_. Controle Biológico de qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. São Paulo. 4 ed., 2015. Cap. VII. p. 385-446.

RITO, P.N. **O estudo da notificação à vigilância sanitária dos eventos adversos causados por produtos cosméticos**. 2013. 122 f. Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

RODRIGUES, R.H.R.M. **Avaliação do controle de qualidade realizado nas farmácias de manipulação de medicamentos e as ações de vigilância sanitária no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. 2010.105 f. Dissertação de Mestrado Profissional em Vigilância em Saúde. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

ROSANIA, R. et al. Nutrition in Patients with Gastric Cancer: An Update. **Gastrointest Tumors**, v. 2, p. 178-187, 2015.

RYK, C. et al. Outcome after BCG treatment for urinary bladder cancer may be influenced by polymorphisms in the NOS2 and NOS3 genes. **Redox Biol.**, v. 6, 2015. Disponível em:  
< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000981>>  
Acesso em: 01 out. 2015.

SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: Types, trends and patterns. **PDA J Sci and Tech.**, v. 65, p. 392-403, 2011.

\_\_\_\_\_. Application of quality risk management to set viable environmental monitoring frequencies in biotechnology processing and support areas. **PDA J Sci and Tech.**, v. 66, n. 6, p. 560-579, 2012.

\_\_\_\_\_. Examination of the order of incubation for the recovery of bacteria and fungi from pharmaceutical-grade cleanrooms. **Int J Pharm Compd.** v. 18, n. 3, p.242-247, 2014a.

\_\_\_\_\_. Fungal contamination of pharmaceutical products: a growing menace. **European Pharmaceutical Review.** v. 19, n.1, p. 68-71, 2014b.

\_\_\_\_\_. Risk of Microbial Spores in Cleanrooms. Part 1: Introduction to Microbial Spores and Survival Mechanisms. 2016. **Clean Air and Containment Review**, v. 28. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/309548680\\_Risk\\_of\\_Microbial\\_Spores\\_in\\_Cleanrooms\\_Part\\_1\\_Introduction\\_to\\_Microbial\\_Spores\\_and\\_Survival\\_Mechanisms](https://www.researchgate.net/publication/309548680_Risk_of_Microbial_Spores_in_Cleanrooms_Part_1_Introduction_to_Microbial_Spores_and_Survival_Mechanisms)

> Acesso em: 20 jan. 2017.

\_\_\_\_\_. Sanitation of Pharmaceutical Facilities. **Journal of GXP Compliance**. v.18, n. 3. 2014c. Disponível em: < <http://www.ivtnetwork.com/article/sanitization-pharmaceutical-facilities>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

\_\_\_\_\_. Settle plate exposure under unidirectional airflow and the effect of weight loss upon microbial growth. **EJPPS**., v. 20, n. 2, p. 45-50, 2015.

SANDLE, T.; LEAVY, C.; RHODES, R. Assessing airborne contamination using a novel rapid microbiological method. **EJPPS**., v. 19, n. 4, p. 131-142, 2014.

SANDLE, T. et al. Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments. **J Appl Microbiol.**, v. 116, p. 1495-1505, 2014a.

\_\_\_\_\_. In vitro fungicidal activity of biocides against pharmaceutical environmental fungal isolates. **J Appl Microbiol.**, v. 117, p.1267-1273, 2014b

**SBCC. Principais mudanças da Norma ISO 14644-1:2015 (Cleanrooms and associated controlled environments – Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration)**. São Paulo, 2016. Disponível em:

<<http://sbcc.com.br/principais-mudancas-da-normasiso-14644-12015-cleanrooms-and-associated-controlled-environments-part-1-classification-of-air-cleanliness-by-particle-concentration/>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

SCHIERL, R; BOHLANDT, A; NOWAK, D. Guidance Values for Surface Monitoring of Antineoplastic Drugs in German Pharmacies. **Ann Occup Hyg.**, v. 53, n. 7, p. 703-711, 2009.

SHINTANI, H. Validation studies for microbial contamination and control of contaminants. **Biocontrol Sci.**, v. 20, n. 3, p. 161 – 170, 2015a.

\_\_\_\_\_. Validation study on how to avoid microbial contamination during pharmaceutical production. **Biocontrol Sci.**, v. 20. n. 1. p. 1-10, 2015b.

SILVA, A.C.P. et al. Desafios para a rede nacional de laboratórios de vigilância sanitária: o caso dos medicamentos manipulados. **Ciênc Saúde Coletiva.**, v. 15, supl. 3, p. 3371-3380, 2010.

SIMMONS, R.B.; CROW, S.A. Fungal colonization of air filters for use in heating, conditioning (HVAC) systems. **J Ind Microbiol.**, v. 14, p. 41-45, 1995.

SMITH, R.M. et al. Fungal infections associated with contaminated methylprednisolone injections. **N Engl J Med.**, v. 369, n. 17, p.1598-1609, 2013.

STEWART, S.L. et al. Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. **Appl Environ Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1232-1239, 1995.

TOUZIN, K. et al. Cyclophosphamide contamination observed on the external surfaces of drugs vial and the efficacy of cleaning on vial contamination. **Ann Occup Hyg.**, v. 52, n. 8, p. 765-771, 2008.

USP. **Disinfectants and Antiseptics**, 39 ed. Rockville:The United States Pharmacopeial Convencional, 2016a. 1 CD-ROM.

\_\_\_\_\_. **Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments**.39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convencional, 2016b. 1 CD-ROM.

\_\_\_\_\_. **Microbiological Evaluation of Clean Rooms and other controlled Environments**.39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convencional, 2011.

\_\_\_\_\_. **Pharmaceutical Compounding – Sterile Preparations**. 39 ed. Rockville:The United States Pharmacopeial Convencional, 2016c. 1 CD-ROM.

VIJAYAKUMAR, R; ABOODY, M.S.; SANDLE, T. A review of melanized (black) fungal contamination in pharmaceutical products - incidence, drug recall and control measures. **J Appl Microbiol.**, v.120, p. 831-841, 2015.

VIJAYAKUMAR, R.; SANDLE, T.; MANOHARAN, C. A review on fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional methods. **EJPPS.**, v. 17, n.1, p. 4-19, 2012.

VYAS, N. et al; Occupational exposure to anti-cancer drugs: A review of effects of new technology. **J Oncol Pharm Practice.**, v. 20, n.4, p. 278 - 287, 2014.

WAITZBERG, D. (Org.). Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia em cuidados paliativos. **Rev Bras Cuidados Paliativos**, São Paulo. n. 3, v. 3, supl 1, 2011.

WEISSFELD, A. Straight from thre Headlines: What is going on in compounding Pharmacies, and How can clinical Microbiologists help? **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 10, p. 3168-3170, 2013.

WILSON, S.C. et al. Mold contamination and air handling units. **J Occup Environ Hyg.**, n. 4, p. 483 - 491, 2007.

WHYTE, W. A Cleanroom Contamination Control. **EJPPS.**, v. 7, n. 2, p. 55-61, 2002.

\_\_\_\_\_. **Cleanroom Technology.** Fundamental of Design, Testing and Operation. London, 2003.

WHO. **Environmental Monitoring of clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities:** Points to consider for manufacturers of human vaccines. Geneva, 2012. Disponível em:  
<[http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/env\\_monitoring\\_cleanrooms\\_final.pdf](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2015.

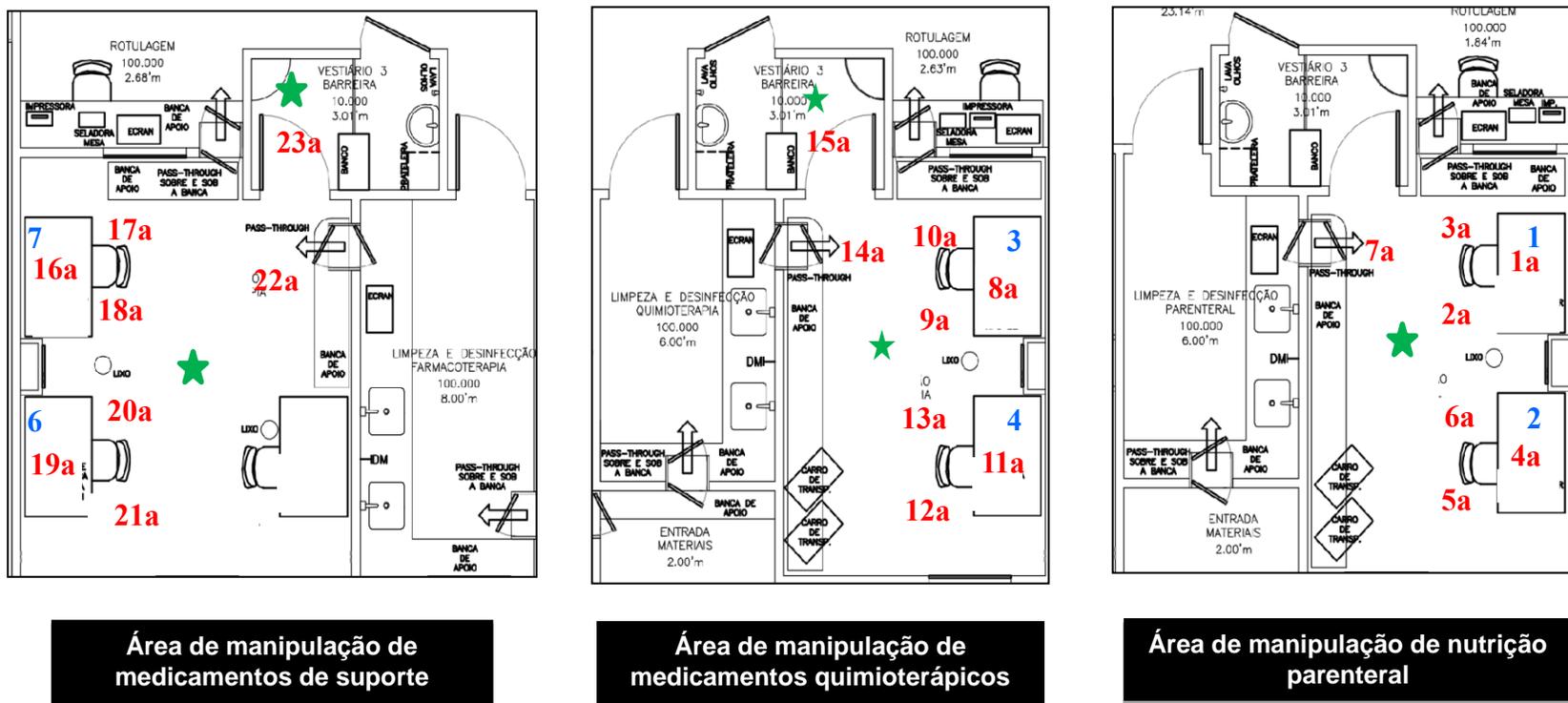
\_\_\_\_\_. **Good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products.** WHO Technical Report Series, n. 961, Annex 6, 2011. Disponível em:  
<[http://apps.who.int/prequal/info\\_general/documents/TRS961/TRS961\\_Annex6.pdf](http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex6.pdf)>  
Acesso em: 05 jul. 2015.

\_\_\_\_\_. **Guideline for indoor air quality: dampness and mould.** WHO Regional Office for Europe. Denmark, 2009. Disponível em:  
<<http://www.who.int/indoorair/publications/7989289041683/en/>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

WU, G.F.; LIU, X.H. Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. **J Zhejiang Univ Sci B.**, v. 8, n. 9, p. 666-672, 2007.

YOSHIDA, J. et al. Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. **J Oncol Pharm Practice.**, v. 17, n. 1, p. 29 – 38, 2010.

## ANEXO A - PLANTA BAIXA DA ÁREA LIMPA COM OS PONTOS DE AMOSTRAGEM ATIVA DO AR

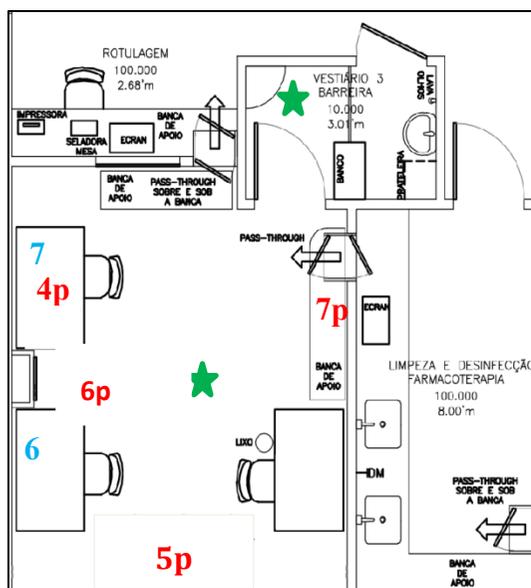


★ Área Grau C

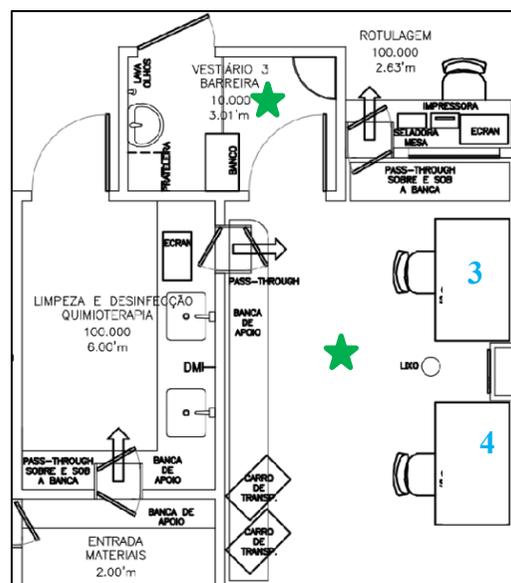
Números em vermelho – pontos de amostragem ativa do ar

Números em azul – numeração dos equipamentos (CSB e EFU)

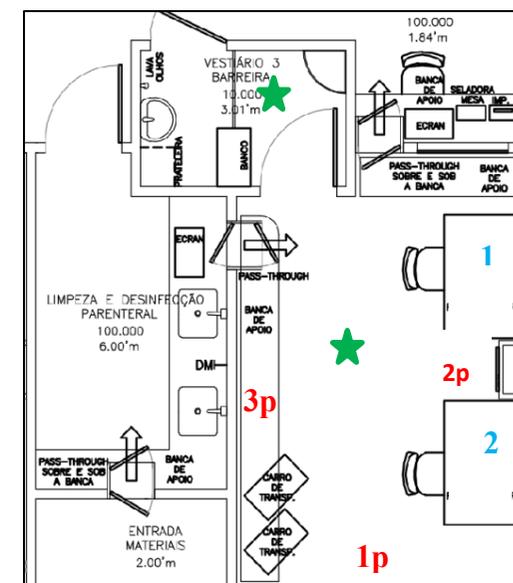
## ANEXO B - PLANTA BAIXA DA ÁREA LIMPA COM OS PONTOS DE AMOSTRAGEM PASSIVA DO AR



Área de manipulação de medicamentos de suporte



Área de manipulação de medicamentos quimioterápicos



Área de manipulação de nutrição parenteral

★ Área Grau C

Números em vermelho – pontos de amostragem passiva do ar

Números em azul – numeração dos equipamentos (CSB e EFU)

APÊNDICE A – PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

**PLANO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL DE UMA ÁREA LIMPA DE  
MANIPULAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTI-CÂNCER, DE SUPORTE E  
NUTRIÇÃO PARENTERAL**

Marcelle Jacomelli Ramos

2017

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	126
2.	PRÉ-REQUISITOS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL EM UMA ÁREA LIMPA.....	131
3.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NAS LUVAS DOS MANIPULADORES E DOS FUNCIONÁRIOS DE SUPORTE.....	135
4.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NO VESTUÁRIO DOS FUNCIONÁRIOS.....	137
5.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NAS SUPERFÍCIES DA ÁREA LIMPA EM OPERAÇÃO.....	139
6.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS POR AMOSTRAGEM ATIVA E PASSIVA DO AR EM OPERAÇÃO.....	142
7.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS EM REPOUSO.....	145
8.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS APÓS A LIMPEZA E DESINFECÇÃO DA ÁREA LIMPA.....	148
9.	PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS TOTAIS, DIFERENCIAL DE PRESSÃO, TEMPERATURA E UMIDADE EM OPERAÇÃO E EM REPOUSO.....	150
10.	CONDUTAS A SEREM REALIZADAS AO EXCEDER O LIMITE DE ALERTA NO MONITORAMENTO DE PARTÍCULA TOTAL E VIÁVEL DO AR, DA SUPERFÍCIE E DO FUNCIONÁRIO.....	153
11.	CONDUTAS A SEREM REALIZADAS AO EXCEDER O LIMITE MÁXIMO (DESVIO) NO MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS DO AR, DOS FUNCIONÁRIOS E DAS SUPERFÍCIES.....	154
11.1.	Ações comuns .....	154
11.2.	Ações específicas.....	155
11.2.1.	Desvio da luva ou no vestuário do manipulador e do funcionário de suporte.....	155
11.2.2.	Desvio na superfície interna do EFU/CSB ou dos materiais inseridos nos equipamentos (Grau A).....	156

11.2.3.	Desvio na superfície dos mobiliários e dos materiais na sala de manipulação e antecâmara (Grau C).....	157
11.2.4.	Desvio de partícula viável no monitoramento após a limpeza e desinfecção da área limpa.....	158
11.2.5.	Desvio de partícula viável no ar do EFU/CSB (Grau A).....	159
11.2.6.	Desvio de partícula viável no ar da sala de manipulação, antecâmara e sala de higienização (Grau C e D).....	160
11.2.7.	Desvio no monitoramento de partícula total em operação.....	162
11.2.8.	Desvio no diferencial de pressão, temperatura e umidade.....	162
11.3.	Condutas em caso de reincidência do desvio na luva ou no vestuário do manipulador e do funcionário de suporte.....	162
11.3.1.	Condutas no caso de reincidência do desvio no monitoramento de partículas viáveis do ar e da superfície e de partículas totais.....	163
12.	REFERÊNCIAS.....	164

**LISTA DE APÊNDICES**

APÊNDICE A	MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS EM SUPERFÍCIE EM OPERAÇÃO.....	168
APÊNDICE B	MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS DO AR EM OPERAÇÃO.....	169
APÊNDICE C	MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS EM REPOUSO.....	170
APÊNDICE D	MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS DAS SUPERFÍCIES APÓS A LIMPEZA E DESINFECÇÃO DA ÁREA LIMPA.....	171
APÊNDICE E	NÚMERO DE PONTOS PARA AMOSTRAGEM DE PARTÍCULAS TOTAIS EM ÁREA LIMPA.....	172
APÊNDICE F	ENSAIOS PARA COMISSONAMENTO, QUALIFICAÇÃO E REQUALIFICAÇÃO DE UMA ÁREA LIMPA DE PRODUTOS ESTÉREIS FARMACÊUTICOS – PARTE 1.....	173
APÊNDICE G	ENSAIOS PARA COMISSONAMENTO, QUALIFICAÇÃO E REQUALIFICAÇÃO DE UMA ÁREA LIMPA DE PRODUTOS ESTÉREIS FARMACÊUTICOS – PARTE 2.....	174
APÊNDICE H	MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS TOTAIS, DIFERENCIAL DE PRESSÃO E TEMPERATURA E UMIDADE EM OPERAÇÃO E EM REPOUSO.....	175
APÊNDICE I	FLUXOGRAMA DO MONITORAMENTO AMBIENTAL DA ÁREA LIMPA EM OPERAÇÃO E EM REPOUSO.....	176

## 1. INTRODUÇÃO

O monitoramento ambiental em uma área limpa é uma ferramenta do programa de garantia da qualidade e, quando planejado e executado de forma rigorosa, permite aumentar o nível de qualidade do ambiente de produção de injetáveis, principalmente os de processamento asséptico<sup>5,8,32</sup>. O objetivo é identificar a estabilidade e as mudanças no cenário da microbiota do ambiente de produção a fim de demonstrar alterações ou falhas nos processos<sup>9,21</sup>. Logo, o monitoramento permite avaliar o desempenho do sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado (HVAC - *heating, ventilation, air conditioning*), a estrutura física da área, os procedimentos de paramentação e assepsia dos funcionários, funcionamento dos equipamentos e seguimento criterioso dos processos de produção<sup>4,13,31</sup>.

O monitoramento ambiental deve ser realizado em dois momentos: durante o processo de produção (em operação) e após o término da produção (em repouso)<sup>4,9</sup>. O monitoramento em operação avalia as práticas assépticas durante o processo de produção. Visa acompanhar a qualidade do ambiente principalmente durante as fases críticas do processo produtivo e permite identificar os momentos de risco, possibilitando ações para a correção e a prevenção da contaminação do produto. O monitoramento em repouso avalia o desempenho do sistema HVAC no restabelecimento do ambiente após um curto período de recuperação e permite ser uma base de informação da microbiota após a desocupação da área. Além disso, o monitoramento também deve ser realizado após os procedimentos de limpeza e desinfecção a fim de avaliar a eficiência dessas práticas e o grau de treinamento dos funcionários responsáveis por tal atividade<sup>4,10,20,22,32</sup>.

O monitoramento ambiental engloba o monitoramento de partículas não viáveis e viáveis<sup>4,10</sup>. O monitoramento de partículas não viáveis é realizado através da contagem de partículas totais de diâmetro acima de 0,5  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  suspensas no ar. Os micro-organismos são carregados pelo ar associados, geralmente, a partículas de diâmetro entre 10-20  $\mu\text{m}$ . Portanto, esse tipo de monitoramento não tem o objetivo de avaliar o conteúdo microbiológico<sup>4</sup>, mas sim a qualidade e a possibilidade de contaminação do ambiente de produção. Além disso, o monitoramento contínuo do diferencial de pressão, a fim de controlar e evitar o fluxo de contaminantes entre as diferentes classificações de áreas, e da temperatura e umidade, a fim de inibir e

controlar a proliferação de micro-organismos e garantir o conforto dos funcionários no ambiente de produção são fundamentais na garantia da qualidade do produto e do ambiente de produção<sup>4,10,33</sup>.

O monitoramento de partículas viáveis é realizado com o objetivo de controlar o conteúdo microbiológico na área de produção, dentro de limites específicos, através da amostragem ativa e passiva do ar, das superfícies e dos funcionários<sup>4,21</sup>.

A amostragem ativa do ar é um método baseado na captação de um volume estabelecido de ar, com partículas de diversos diâmetros, e sua impactação em meios de cultura para pesquisa de bactérias e fungos<sup>3</sup>. A desvantagem do método é a limitação do volume de ar amostrado, que pode não ser representativa do ambiente de produção e não ser capaz de detectar eventuais contaminações que possam ocorrer durante o processo de produção<sup>4,19</sup>.

O método passivo de amostragem do ar se baseia na exposição, por um período estabelecido, de placas de Petri com meio de cultura para pesquisa de bactérias e fungos<sup>16,21</sup>. Embora seja um método simples e de baixo custo<sup>8</sup>, o seu uso isolado no monitoramento ambiental não é recomendado devido à limitação do método em detectar apenas os micro-organismos suspensos no ar capazes de se depositarem na superfície<sup>9,16</sup>, contudo permite o monitoramento contínuo e a possibilidade de conhecer os níveis de biocontaminação do ambiente durante todo o processo de produção<sup>5,19</sup>.

A análise das superfícies de uma área de manipulação de injetáveis é imprescindível em um plano de monitoramento ambiental. Engloba o monitoramento das superfícies dos materiais, da infraestrutura, dos mobiliários e dos funcionários. Permite avaliar as práticas de higiene e limpeza dos equipamentos, dos utensílios e da estrutura física da área limpa, bem como a competência dos funcionários no cumprimento rigoroso das condutas e práticas de trabalho<sup>21,29,30</sup>.

A análise dos funcionários envolvidos no processo de manipulação é fundamental, pois são considerados os principais carreadores de contaminantes em preparações estéreis<sup>21,29</sup>. Uma das principais fontes de introdução e transferência de micro-organismos é através do contato pelas luvas dos funcionários. Esse tipo de amostragem permite detectar a biocontaminação na imediação da área de trabalho<sup>4,21,29</sup>. Outra possível fonte de contaminação pode ser oriunda do vestuário utilizado dentro da área limpa devido à proximidade do funcionário com o produto manipulado. Portanto, a amostragem frequente das superfícies dos funcionários (luvas e vestuários) permite avaliar as práticas de trabalho<sup>4,27</sup>.

O conhecimento qualitativo da microbiota quanto ao gênero e/ou espécie em uma área limpa é importante, pois permite criar um banco de dados dos micro-organismos encontrados na área limpa, avaliar os níveis e tipos de micro-organismos presentes no monitoramento realizado como rotina e as tendências de ocorrência e mudanças dos principais grupos da microbiota<sup>20,21,27</sup>. Outra vantagem é a possibilidade de determinar o uso de agentes desinfetantes mais eficazes contra essa microbiota presente na área e o acompanhamento de possíveis resistências a esses agentes químicos<sup>17,24,26</sup>.

Embora a caracterização e a identificação da microbiota presente na área não sejam obrigatórias, e sim uma orientação, principalmente quando os limites de ação são excedidos, recomenda-se que a identificação faça parte do programa de monitoramento, pois essas informações permitem conhecer as características dos micro-organismos quanto à capacidade de resistência e patogenicidade, identificar as possíveis fontes de contaminação e correlacionar com práticas de limpeza, desinfecção e higiene dos funcionários, permitindo o planejamento de ações efetivas<sup>18,27</sup>. Pode ser estabelecido um esquema de caracterização e identificação dos micro-organismos a partir da classificação da área e o limite (alerta ou ação) atingido no monitoramento. Em ambientes menos rigorosos, Graus C e D, pode ser feita a caracterização microbiana quando atingido o limite de alerta e a identificação, quando atingido o limite de ação. Em ambientes críticos, Graus A e B, devem ser realizadas a identificação dos micro-organismos, independente do limite atingido<sup>20</sup>.

A identificação dos micro-organismos deve estar atrelada à classificação da área, à atividade desempenhada e ao item amostrado (vestimenta, mão do funcionário, água, ar e superfície), para que possíveis migrações de micro-organismos possam ser identificadas a fim de se estabelecer uma relação causal<sup>9,23</sup>.

Para avaliar o estado de controle ambiental quanto à contaminação microbiana durante o processo de produção de soluções injetáveis é necessário um plano de monitoramento detalhado para cada área de produção. Esse plano deve definir materiais a serem monitorados, locais e métodos de amostragem, meios de cultura empregados, frequência e momento da amostragem.

É importante que o monitoramento ambiental contemple o posicionamento, a circulação, a proximidade à área crítica e os locais de entrada e saída de materiais e equipamentos de uma área de menor classificação para uma área de maior classificação<sup>27</sup>. Os locais de amostragens que não oferecem risco direto de

contaminação ao produto, como teto, parede e chão, podem ser incluídos no plano de amostragem de forma aleatória<sup>29,32</sup>.

Os resultados do monitoramento permitem criar ferramentas como gráficos de tendência histórica, estabelecer e atualizar os limites de alerta e ação para os parâmetros que se quer acompanhar, estabelecer condutas corretivas e preventivas no caso dos níveis de contaminação exceder esses limites e investigação quando for identificada contaminação pontual ou sequencial<sup>16,20,25</sup>.

Para determinação dos **limites de alerta** do ar e das superfícies de uma área limpa é recomendado utilizar os resultados históricos das amostragens realizadas na área. Na elaboração desse manual foram considerados, no mínimo, 100 resultados para cada ponto ou área amostrada. Os limites de alerta foram calculados pelo método “*Cut off Value Approach*” – Abordagem de Valor de Corte, um dos métodos descritos no Guia PDA *Technical Report* Nº13 - *Fundamentals of an Environmental Monitoring Program* de 2014. Os valores acima do limite máximo estabelecido pelas agências reguladoras foram excluídos dos cálculos, pois poderiam gerar valores de limites de alerta altos, inclusive acima do máximo especificado pela legislação.

Para o cálculo foi necessário estabelecer a frequência absoluta para cada valor encontrado, seguido de cálculo da frequência relativa e posteriormente a frequência relativa cumulativa. O resultado correspondente ao percentil 95% foi determinado como o limite de alerta.

Os Guias de Monitoramento Ambiental (FDA GMP, EU GMP, JP GMP, USP < 1116>, WHO TRS 961) e Guia de Qualidade da ANVISA (Guia da qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica) sugerem a frequência mínima e os locais considerados críticos para o monitoramento de partículas viáveis, embora não haja definição do número de pontos para a amostragem de rotina. A definição da frequência, número de pontos a serem amostrados e os locais críticos para o processo de produção devem ser baseados, preferencialmente, em uma análise de risco<sup>4,9,20</sup>. A avaliação de risco em uma determinada área de processamento asséptico torna o programa de monitoramento ambiental mais significativo e permite orientar a amostragem para locais do processo onde o risco de contaminação é maior. A partir dessa avaliação, é possível estabelecer a frequência de amostragem baseada nos níveis de risco para cada área ou processo<sup>22</sup>.

Esse manual contém um plano de monitoramento ambiental de partículas viáveis e totais, de diferencial de pressão e de temperatura e umidade, com a descrição dos procedimentos, frequência mínima, momento e sugestões de locais para a amostragem do ar, da luva, do vestuário e das superfícies, em operação, em repouso e após a limpeza e desinfecção. Também descreve as condutas e as investigações nos casos dos resultados do monitoramento ultrapassar o limite de alerta, o limite máximo (desvio) e no caso da reincidência do desvio<sup>4,9,32</sup>.

Neste manual foi determinada a amostragem semanal para todas as salas de manipulação (nutrição parenteral, medicamentos de suporte, quimioterapia e BCG) independente do grau de classificação (Graus C e D). Embora a amostragem de superfícies em áreas Grau D não seja requerida, foi estabelecida a amostragem semanal na sala de manipulação de BCG (Grau D) devido à proximidade à CSB.

Os Apêndices A e B e C contêm tabelas com os locais sugeridos e o momento de amostragem em operação e em repouso. O Apêndice D contém o plano de monitoramento da área limpa após a limpeza e desinfecção. O apêndice E contém uma tabela com o número de pontos para amostragem de partículas totais de acordo com Norma ISO 14644-1 de 2015 e os Apêndices F e G contêm tabelas com os ensaios e os resultados aceitáveis para a qualificação e requalificação de uma área limpa. O apêndice H contém o plano de monitoramento de partículas totais, de diferencial de pressão e de temperatura e umidade e o Apêndice I há um fluxograma do monitoramento ambiental.

## 2. PRÉ-REQUISITOS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL

- Os pontos e a frequência de amostragem devem ser definidos preferencialmente em uma análise de risco<sup>4,20</sup>;
- Os pontos definidos no plano de monitoramento não podem ser modificados sem justificativa prévia<sup>13</sup>;
- Para a realização do monitoramento ambiental é imprescindível que as requalificações do sistema HVAC<sup>\*</sup> da área limpa, do equipamento de fluxo unidirecional (EFU) e da cabine de segurança biológica (CSB) estejam vigentes e os parâmetros testados, em conformidade<sup>10</sup>;
- Os equipamentos para amostragem devem estar calibrados no momento da amostragem. A data da realização da calibração e sua validade devem constar no aparelho e no relatório do ensaio<sup>15,20</sup>.
- Para evitar o carreamento de contaminantes para a área limpa, o ideal é que os equipamentos de contagem de partículas sejam de uso exclusivo<sup>9,32</sup>.
- Os funcionários responsáveis pela execução dos ensaios e manutenção do sistema, infraestrutura e equipamentos da área limpa devem estar treinados e capacitados para a realização das atividades<sup>20</sup>;
- Os funcionários da limpeza, antes de iniciarem as atividades dentro da área limpa, devem passar por treinamento, qualificação e requalificação anualmente<sup>9, 20</sup>. Quando for necessária a entrada de um funcionário na área limpa que não tenha sido treinado é fundamental a orientação prévia das condutas e a supervisão das atividades<sup>7, 10</sup>;

---

<sup>\*</sup>Requalificação do sistema HVAC – testes necessários para assegurar que o sistema ou equipamento tenha sido projetado, construído e opere dentro dos limites de aceitação de acordo com as regras de Boas Práticas de Fabricação. A qualificação deve ser executada em operação e em repouso (ANVISA). Os ensaios de requalificação estão descritos nos Apêndices H e I.

- Deve haver um programa, no mínimo anual, de qualificação\* e requalificação dos funcionários envolvidos no processo de manipulação<sup>20</sup>;
- Deve haver descrito o procedimento das etapas da limpeza e desinfecção de equipamentos necessários para manutenção da área limpa, tanto para a entrada na área Grau D quanto para a entrada na área Grau C, e principalmente na área Grau A;
- As tampas dos equipamentos para a amostragem de partículas viáveis do ar devem ser esterilizadas para cada processo de amostragem;
- Os procedimentos de antissepsia das mãos, técnica de colocação das luvas, paramentação e desparamentação do vestuário devem estar descritos, vigentes e validados. Esses procedimentos devem ser de conhecimento de todos os funcionários que entram na área limpa (funcionários da manipulação, da limpeza e desinfecção, do controle microbiológico e da manutenção da infraestrutura, do sistema HVAC e dos equipamentos<sup>7,9,10,29</sup>;
- Deve haver validação dos agentes desinfetantes utilizados na área limpa<sup>17,26</sup>;
- É fundamental que os agentes empregados na antissepsia das mãos, na limpeza e desinfecção dos materiais e superfícies sejam monitorados quanto à contaminação microbiológica<sup>7,9</sup>;
- Deve haver um programa de rodizio de agentes desinfetantes de diferentes mecanismos de ação empregados na limpeza e desinfecção da infraestrutura da área limpa, dos EFU e das CSB a fim de acessar todos os micro-organismos presentes na área<sup>6,20,24,26</sup>;
- O agente esporocida deve ser empregado nos casos de identificação de micro-organismo formador de esporos nos resultados do monitoramento ambiental de

---

\*Qualificação do funcionário – treinamento teórico e prático das condutas assépticas durante as atividades de manipulação, cuidado com a higiene pessoal, revalidação dos procedimentos de antissepsia das mãos, calçar as luvas, paramentação e media-fill (USP e PDA)

rotina<sup>11</sup>. Devem ser utilizados em menor frequência e de forma alternada com os demais agentes desinfetantes<sup>20,26</sup>;

- Os desinfetantes e detergentes empregados na área Grau A devem ser estéreis<sup>5,10</sup>;
- Deve haver um certificado de avaliação da fertilidade e esterilidade dos meios de cultura utilizados em cada amostragem<sup>4,20,32</sup>;
- A cada fornecimento do vestuário, deve haver um certificado de esterilidade<sup>15</sup>;
- O vestuário estéril deve ser trocado a cada entrada na área limpa;
- Deve haver um estudo de validação de estabilidade do meio de cultura para o monitoramento passivo a fim de evitar a desidratação do meio<sup>32</sup>;
- O meio de cultura geralmente utilizado para pesquisa de bactérias é peptona-caseína-soja (TSA) e para fungos é ágar Sabourand dextrose (SBD). Após a amostragem, os meios de TSA são incubados em temperatura de 30-35°C por um período de 48 a 72h, e o meio SBD incubado em temperatura de 20-25°C por 5 a 7 dias. Outros meios de cultura correspondentes podem ser empregados desde que validados<sup>4,9,29</sup>;
- As placas com meio de cultura para amostragem devem estar à temperatura ambiente a fim de evitar crescimento confluyente devido à condensação<sup>20</sup>;
- As condições de incubação (tempo, temperatura e ordem de incubação) devem ser validadas para o controle microbiológico da área limpa<sup>4,20</sup>;
- Áreas limpas em funcionamento, quando não utilizadas no processo de manipulação, devem ter o monitoramento ambiental realizado para comprovar a manutenção da classificação do ambiente e identificação de mau funcionamento do sistema<sup>10</sup>;

- Após longo tempo (semanas ou meses) de não funcionamento da área limpa, manutenção periódica da infraestrutura da área, do sistema HVAC ou alteração da função dos equipamentos ou procedimentos, devem ser realizados ensaios de requalificação do sistema HVAC\* e avaliação microbiológica por dias seguidos antes do início das atividades, a fim de verificar se os parâmetros da área estão dentro da classificação previamente definida, atendendo os requisitos para manipulação de soluções injetáveis<sup>4</sup>;
- Para a autorização de funcionamento é necessária a realização de três amostragens consecutivas, seguidas de limpeza e desinfecção. Se o resultado das duas amostragens iniciais for satisfatório, a área pode ser liberada para o início das atividades, caso contrário, uma quarta amostragem deve ser realizada. Se o resultado da terceira amostragem for satisfatório, a área pode ser liberada para a manipulação<sup>11</sup>.

---

\*Requalificação do sistema HVAC – testes necessários para assegurar que o sistema ou o equipamento tenha sido projetado, construído e opere dentro dos limites de aceitação de acordo com as regras de Boas Práticas de Fabricação. A qualificação deve ser executada em operação e em repouso (ANVISA). Os ensaios de requalificação estão descritos nos Apêndices H e I.

### **3. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NAS LUVAS DOS MANIPULADORES E FUNCIONÁRIOS DE SUPORTE**

#### **3.1. OBJETIVO**

Avaliar a técnica asséptica durante as atividades de manipulação do manipulador e do funcionário de suporte<sup>20,21,29</sup>.

#### **3.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO**

É um método baseado na pressão dos dedos das duas mãos com luvas em uma placa de contato (RODAC)\* para pesquisa de bactérias e fungos<sup>8,21,29</sup>.

Com a placa aberta dentro do equipamento de fluxo unidirecional (EFU) e das cabines de segurança biológica (CSB), o manipulador deve fazer uma leve pressão dos cinco dedos de uma das mãos com luva, com apoio das digitais, no meio de cultura por ao menos 10 segundos, sem quebra do meio<sup>21,29</sup>. Repetir o mesmo procedimento para a outra mão utilizando uma nova placa RODAC<sup>11,29</sup>. Em seguida, ainda dentro do EFU e da CSB, a placa deve ser tampada.

A amostragem da luva do funcionário de suporte deve ocorrer na sala de manipulação.

Após a amostragem, os meios devem ser incubados por 5 a 7 dias a temperatura de 20-25 °C e a 30-35°C por 2 a 3 dias, para detectar a maioria das bactérias e fungos<sup>9,21,29</sup>.

#### **3.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

A amostragem da superfície da luva dos manipuladores deve ser realizada, no mínimo, uma vez por semana<sup>4</sup>, e em cada turno de manipulação.

---

\*RODAC - placa de contato de 50 mm de diâmetro com meio de cultura não seletivo (TSA) com polissorbato 80 e lecitina de soja.

### 3.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM

A amostragem deve ser realizada na superfície dos cinco dedos de cada mão com luva do manipulador dentro do EFU ou da CSB (área Grau A)<sup>4,7,9,11,29</sup> e do funcionário de suporte (área Grau C)<sup>28</sup>, conforme descrito no Apêndice A. No uso de duas luvas durante a manipulação, a luva externa deve ser amostrada<sup>4</sup>.

### 3.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM

A amostragem da luva deve ser realizada **imediatamente** após o término do processo de manipulação<sup>4,32</sup>.

Os funcionários devem permanecer na posição de trabalho para que seja feita a amostragem na superfície da luva.

A luva a ser amostrada não pode ser limpa, desinfetada ou trocada antes da amostragem<sup>4,9,29</sup> e deve estar seca no momento da amostragem<sup>4,32</sup>.

Em nenhuma hipótese o funcionário deve retornar às atividades sem realizar uma nova antissepsia das mãos e troca dos dois pares de luva<sup>29</sup>.

### 3.6. LIMITE DE ALERTA E LIMITE MÁXIMO

O limite de alerta foi estabelecido baseado nos dados históricos do monitoramento ambiental da área limpa em estudo.

Local de amostragem	Grau de classificação do local de amostragem	Limite de alerta	Limite máximo
Luva do manipulador	A	---	< 1 FC/placa <sup>4,5,7</sup>
Luva do funcionário de suporte	C	5	10 UFC/placa <sup>28</sup>

## **4. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NO VESTUÁRIO DOS FUNCIONÁRIOS**

### **4.1. OBJETIVO**

Avaliar as práticas assépticas durante o processo de manipulação do manipulador e do funcionário de suporte<sup>4,15,21</sup>.

### **4.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO**

É um método baseado na amostragem do vestuário do funcionário através de placas de contato (RODAC)\* para pesquisa de bactérias e fungos<sup>8,21</sup>.

O meio de cultura da placa deve tocar gentilmente a superfície a ser amostrada por no mínimo 10 segundos com pressão constante e uniforme, sem movimento circular ou linear<sup>21</sup>. A placa deve ser tampada imediatamente após a amostragem e ainda na área de amostragem.

Após a amostragem, os meios devem ser incubados por 5 a 7 dias a temperatura de 20-25 °C e a 30-35°C por 2 a 3 dias, para detectar a maioria das bactérias e fungos<sup>9,21,29</sup>.

### **4.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

A amostragem da superfície do vestuário dos funcionários deve ser realizada, no mínimo, uma vez por semana<sup>4</sup>, e em cada turno de manipulação.

### **4.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM**

A amostragem deve ser realizada nas superfícies do vestuário do manipulador dentro do EFU ou da CSB (área Grau A) e do funcionário de suporte (área Grau C), conforme descrito no Apêndice A. No uso de avental estéril sobre o vestuário, a amostragem deve ser realizada no avental.

---

\* RODAC - placa de contato de 50 mm de diâmetro com meio de cultura não seletivo (TSA) com polissorbato 80 e lecitina de soja.

#### 4.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM

A amostragem deve ser realizada **imediatamente** após o término do processo de manipulação. Os funcionários devem permanecer na posição de trabalho para que seja feita a amostragem na superfície do vestuário<sup>4,11,21</sup>.

O vestuário não pode ser trocado antes da amostragem. Após a amostragem, o funcionário deve se desparamentar e descartá-lo conforme rotina estabelecida no setor<sup>11,21</sup>.

Em nenhuma hipótese o funcionário deve retornar às atividades sem trocar o vestuário<sup>11,21</sup>.

#### 4.6. LIMITES MÁXIMOS\*

Local de amostragem	Grau de classificação do local de amostragem	Limite Máximo <sup>4,5,7</sup>
Antebraço Centro do tórax	A	< 1 UFC/placa
Antebraço Axila	C	25 UFC/placa

\*Nesse estudo, os limites de alerta para o centro do tórax, antebraço e axila não foram estabelecidos, pois a amostragem do vestuário não fazia parte da rotina de monitoramento. Porém, é importante realizar o monitoramento do vestuário e estabelecer o limite de alerta com os dados históricos de amostragem.

## 5. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS NAS SUPERFÍCIES DA ÁREA LIMPA EM OPERAÇÃO

### 5.1. OBJETIVO

Determinar e controlar o nível de biocontaminação nas superfícies (equipamentos, utensílios, mobiliários e infraestrutura) da área limpa durante a manipulação<sup>15,29,32</sup>.

### 5.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

É um método baseado na amostragem das superfícies dos equipamentos, utensílios, mobiliários e infraestrutura da área limpa através de placas de contato (RODAC)\* e/ou *swabs* para pesquisa de bactérias e fungos<sup>4,11,20</sup>.

O meio de cultura da placa deve tocar gentilmente a superfície a ser amostrada por no mínimo 10 segundos com pressão constante e uniforme, sem movimento circular ou linear<sup>21</sup>.

O método por *swab* é empregado em superfícies irregulares ou de difícil acesso, em que o uso das placas de contato é inviável<sup>21,29</sup>. Nessa técnica, os *swabs* devem ser umedecidos com um diluente estéril e friccionados sobre a superfície seca em movimentos paralelos, de forma lenta e com rotação, de modo que toda a superfície do *swab* tenha contato com a superfície em análise<sup>15,21</sup>. A superfície amostrada com *swab* deve ser equivalente a uma superfície amostrada por placa de contato (24-30 cm<sup>2</sup>)<sup>10,29</sup>.

A placa ou *swab* devem ser fechados imediatamente após a amostragem e ainda na área de amostragem.

Após a amostragem, os meios devem ser incubados por 5 a 7 dias a temperatura de 20-25 °C e a 30-35°C por 2 a 3 dias, para detectar a maioria das bactérias e fungos<sup>9,21,29</sup>.

---

\* RODAC - placa de contato de 50 mm de diâmetro com meio de cultura não seletivo (TSA) com polissorbato 80 e lecitina de soja.

### 5.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM

A amostragem das superfícies deve ser realizada, no mínimo, uma vez por semana em área Grau A e C.(ANVISA), e em cada turno de manipulação.

Em área Grau D, o guia da ANVISA<sup>4</sup>, não exige amostragem de superfície.

Para sala de manipulação de BCG (área Grau D), foi estabelecida nesse manual, a frequência semanal de amostragem seguindo os mesmos critérios das demais salas de manipulação (Grau C).

### 5.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM

A amostragem deve ser realizada nas superfícies internas do EFU e da CSB (Grau A), nas superfícies dos materiais inseridos no EFU e na CSB e nas superfícies das salas de manipulação, conforme descrito no Apêndice A.

Não há definição nas diretrizes de monitoramento ambiental do número de pontos e dos locais para a amostragem. Inicialmente pode-se estabelecer os locais próximos à área de manipulação, onde o produto está mais exposto, e os materiais que entram em contato com o produto. A definição dos pontos críticos e a frequência de amostragem devem ser feitas, preferencialmente, mediante uma análise de risco<sup>4,20</sup>.

### 5.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM

A amostragem das superfícies internas e dos materiais inseridos na CSB e no EFU (área Grau A) deve ser realizada **imediatamente** após o término do turno de manipulação<sup>4,27</sup>. O funcionário da manipulação deve permanecer na posição de trabalho para que seja feita a amostragem das superfícies.

Nas salas de manipulação (área Grau C), as superfícies e os materiais devem ser preferencialmente amostrados após o término do turno da manipulação<sup>29</sup>, porém podem ser amostrados durante o processo de manipulação, desde que a atividade de amostragem não acarrete em contaminação da área<sup>4,11</sup>.

As superfícies a serem amostradas não podem ser limpas antes da amostragem e devem estar secas<sup>4</sup>.

Imediatamente após a amostragem, as superfícies devem ser limpas e desinfetadas a fim de remover resíduos do meio de cultura<sup>16,21,27</sup> e os materiais descartáveis amostrados não podem ser reutilizados.

## 5.6. LIMITE DE ALERTA E LIMITE MÁXIMO

O limite de alerta foi estabelecido baseado nos dados históricos do monitoramento ambiental da área limpa em estudo. Foi estabelecido um limite único para todas as superfícies em área Grau C e D.

Grau de classificação do local de amostragem	Limite de alerta	Limite máximo <sup>4,5,7</sup>
A	-----	< 1 UFC/placa
C	7 UFC/placa	25 UFC/placa
D	7 UFC/placa	50 UFC/placa

## 6. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS POR AMOSTRAGEM ATIVA E PASSIVA DO AR EM OPERAÇÃO

### 6.1. OBJETIVO

Avaliar a qualidade do ar quanto à contaminação por partículas viáveis durante o processo de manipulação (em operação) através da amostragem ativa e passiva do ar<sup>4,8,21</sup>.

### 6.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

A **amostragem ativa do ar** é um método baseado na utilização de equipamentos (amostradores) capazes de amostrar 1000 Litros de ar e impactá-los em meios de cultura para pesquisa de bactérias e fungos<sup>3</sup>.

A amostragem deve iniciar nas áreas de maior classificação de área (Grau A) para a de menor classificação (Grau D).

O amostrador antes de ser introduzido no equipamento de fluxo unidirecional, deve ser limpo e desinfetado e a tampa do amostrador deve ser esterilizada para cada amostragem realizada.

O amostrador deve ser posicionado sobre uma lâmina de gaze estéril no local determinado. A tampa da placa do meio de cultura deve ser posicionada com a face interna voltada para baixo, sobre uma lâmina de gaze estéril ao lado do equipamento.

O meio de cultura geralmente utilizado para pesquisa de bactérias é o ágar tripton de soja (TSA) e para fungos é o ágar Sabouraud dextrose 4% (SBD). Também pode ser empregado um único meio de cultura (TSA) com alternância da ordem de incubação para a identificação de bactérias e fungos<sup>8,27</sup>.

A **amostragem passiva do ar** é um método baseado na exposição de placas de Petri de diâmetro específico (geralmente 90 mm), com meio de cultura, por um determinado período de tempo<sup>16,21</sup>.

A placa com meio de cultura estéril deve ser inserida no EFU e na CSB (Grau A) e posicionada sobre uma lâmina de gaze estéril próxima à área de trabalho. Após a abertura da placa, a tampa do meio de cultura deve ser posicionada com a face interna voltada para baixo, sobre uma lâmina de gaze estéril ao lado do equipamento.

O tempo de exposição deve ser validado e não deve ultrapassar 4 horas de exposição<sup>4</sup>.

Após a amostragem, o meio deve ser incubado por 5 a 7 dias a temperatura de 20-25 °C e a 30-35°C por 2 a 3 dias, para detectar a maioria das bactérias e fungos<sup>9, 21, 29</sup>.

### **6.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

A amostragem ativa e passiva do ar deve ocorrer, no mínimo, uma vez por semana nas áreas Grau A e C. Na área Grau D, a recomendação é de, no mínimo, uma vez por mês<sup>4</sup>, e em cada turno de manipulação.

Apesar da sala de manipulação de BCG ser área Grau D e, a ANVISA<sup>4</sup> estabelecer para essa classificação de ar amostragem mensal, foi estabelecido nesse manual a frequência semanal de amostragem seguindo os mesmos critérios das demais salas de manipulação Grau C.

### **6.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM**

A amostragem deve ser realizada dentro do EFU e da CSB (Grau A), na sala de manipulação (Grau C) e nas salas adjacentes (Grau D), conforme descrito no Apêndice B.

Não há definição nas diretrizes de monitoramento ambiental do número de pontos e dos locais para a amostragem. Inicialmente pode-se estabelecer os locais próximos à área de manipulação (área crítica), onde o produto está mais exposto, áreas de grande circulação de pessoas e materiais, proximidade a portas e *pass-throughs*, e locais que sejam representativos de toda a área. A definição dos pontos críticos e a frequência de amostragem devem ser feitas, preferencialmente, mediante uma análise de risco<sup>4,20</sup>.

### **6.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM**

A amostragem deve ser realizada durante o processo de manipulação para as áreas Grau A e C e durante as atividades na área Grau D.

## 6.6. LIMITES DE ALERTA

A tabela abaixo relaciona os limites de alerta estabelecidos baseados nos dados históricos do monitoramento ambiental da área limpa em estudo.

Área de amostragem	Pontos de amostragem	Grau de classificação do local de amostragem	Limite de alerta	
			Ar (ativa) (UFC/m <sup>3</sup> )	Superfície (UFC/placa)
Nutrição parenteral	Sala de manipulação	C	20	7
	Antecâmara	C	25	
Quimioterapia	Sala de manipulação	C	45	7
	Antecâmara	C	25	
BCG	Sala de manipulação	D	55	7

Nesse estudo, os limites de alerta para a amostragem passiva do ar não foram estabelecidos, pois esse tipo de amostragem não fazia parte da rotina de monitoramento.

## 6.7. LIMITES MÁXIMOS

Grau de classificação da área limpa	Amostragem do ar <sup>4,5,7</sup>	
	Ativa (UFC/m <sup>3</sup> )	Passiva (UFC < 4 horas)
A	< 1	< 1
C	100	50
D	200	100

## **7. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS EM REPOUSO**

### **7.1. OBJETIVO**

Avaliar a qualidade do ambiente (ar e superfície) de produção após o encerramento das atividades e após o período de recuperação\* da área limpa<sup>5,7</sup>.

### **7.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO**

Os procedimentos realizados são a amostragem das superfícies e do ar (método ativo e passivo) já descritos no plano de monitoramento de partículas viáveis na superfície (item 5 - Plano de Monitoramento de partículas viáveis, nas superfícies da área limpa em operação) e do ar (item 6 - Plano de monitoramento de partículas viáveis por amostragem ativa e passiva do ar em operação).

### **7.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

As amostragens de ar e das superfícies nas áreas Grau A e C devem ocorrer, no mínimo, uma vez por semana e no mesmo dia da amostragem em operação.

Em área Grau D, a frequência mínima de amostragem do ar deve ser uma vez por mês e no mesmo dia da amostragem em operação.

O guia da ANVISA<sup>4</sup> não exige amostragem de superfície em área Grau D.

Apesar da sala de manipulação de BCG ser área Grau D e, a ANVISA<sup>4</sup> estabelecer a amostragem mensal para área com essa classificação e, não exigir a amostragem de superfície, foi estabelecido nesse manual a frequência semanal de amostragem seguindo os mesmos critérios das demais salas de manipulação (Grau C).

### **7.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM**

As amostragens devem ser realizadas em pelo menos 1 ponto dentro do EFU/CSB e 1 ponto na sala de manipulação, conforme descrito no Apêndice C.

---

\* Período de recuperação - tempo (15 a 20 minutos) para a área limpa restabelecer as condições de repouso após a conclusão das operações. Período de recuperação realizado nos ensaios de requalificação da área limpa. Detalhes do ensaio no Apêndice G.

O ponto escolhido para ser amostrado em repouso na sala de manipulação deve ser o mesmo ponto medido em operação e, de preferência, o mais crítico para o processo de manipulação<sup>32</sup>.

### 7.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM

A amostragem do ar e das superfícies deve ser realizada **imediatamente** após o período de recuperação da área limpa<sup>33</sup>.

Após a amostragem, a superfície deve ser limpa e desinfetada a fim de remover o meio de cultura residual<sup>27</sup>.

### 7.6. LIMITES DE ALERTA

O limite de alerta para amostragem em repouso é o mesmo em operação.

Área de amostragem	Pontos de amostragem	Grau de classificação do local de amostragem	Limite de alerta	
			Ar (ativa) (UFC/m <sup>3</sup> )	Superfície (UFC/placa)
Nutrição parenteral	Sala de manipulação	C	20	7
	Antecâmara	C	25	
Quimioterapia	Sala de manipulação	C	45	7
	Antecâmara	C	25	
BCG	Sala de manipulação	D	55	7

Nesse estudo, os limites de alerta para a amostragem passiva do ar não foram estabelecidos, pois esse tipo de amostragem não fazia parte da rotina de monitoramento.

**7.7. LIMITE MÁXIMO**

Grau de classificação da área limpa	Amostragem do ar <sup>4,5,7</sup>		Superfície <sup>4,5,7</sup> (UFC/placa)
	Ativa (UFC/m <sup>3</sup> )	Passiva (UFC < 4 horas)	
A	< 1	< 1	< 1
C	100	50	25
D	200	100	50

## **8. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS APÓS A LIMPEZA E DESINFECÇÃO DA ÁREA LIMPA**

### **8.1. OBJETIVO**

Determinar a qualidade do ambiente de produção após a limpeza e desinfecção da área limpa a fim de avaliar a eficiência dessas práticas bem como o grau de treinamento dos funcionários responsáveis por essa atividade<sup>4,10,20</sup>.

### **8.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO**

O procedimento realizado é a amostragem das superfícies, já descrita no plano de monitoramento na superfície (item 5 - Plano de Monitoramento de partículas viáveis nas superfícies da área limpa em operação).

### **8.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

A frequência de amostragem de superfícies após a limpeza e desinfecção não está descrita nas diretrizes de monitoramento ambiental. No entanto, para esse manual foi estabelecido a amostragem semanal para esse tipo de ensaio.

### **8.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM**

A amostragem deve ser realizada nas superfícies dos EFU/CSB, nas salas de manipulação e nas antecâmaras, conforme Apêndice D.

### **8.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM**

A amostragem deve ser realizada nas superfícies após a conclusão da limpeza e desinfecção da área limpa.

Após a amostragem, a superfície deve ser limpa e desinfetada a fim de remover o meio de cultura residual<sup>27</sup>.

## 8.6. LIMITE DE ALERTA E LIMITE MÁXIMO

O limite de alerta para amostragem em superfícies após a limpeza e desinfecção é o mesmo estabelecido para a área em operação.

Grau de classificação da área limpa	Limite de alerta	Limite máximo <sup>4,5,7</sup>
A	—	< 1 UFC/placa
C	7 UFC/placa	25 UFC/placa
D	7 UFC/placa	50 UFC/placa

## **9. PLANO DE MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS TOTAIS, DIFERENCIAL DE PRESSÃO, TEMPERATURA E UMIDADE DA ÁREA LIMPA EM OPERAÇÃO E EM REPOUSO**

### **9.1. OBJETIVO**

Especificar a concentração de partículas de diâmetros acima de 0,5 µm e 5 µm durante a manipulação (em operação) e em repouso, verificar a capacidade do sistema em manter as diferenças de pressão entre áreas adjacentes e a capacidade do sistema de tratamento de ar manter sob controle os níveis de temperatura e de umidade<sup>4,7,33</sup>.

### **9.2. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO**

A amostragem de ar para contagem das partículas totais é realizada com um equipamento para contagem de partículas capaz de registrar a concentração e o diâmetro das partículas suspensas no ar. A posição para amostragem deve ser na altura do trabalho e a uma distância de 30 cm das atividades operacionais<sup>4,32</sup>.

O número de pontos para a amostragem em cada área deve seguir a tabela da ISO 14644-1 de 2015 (Apêndice E).

O volume de amostragem depende da classificação da área e o tempo depende da vazão do amostrador<sup>12</sup>. Detalhes do procedimento estão descritos nos Apêndices F e G.

Em ambientes adjacentes onde o diferencial de pressão é relevante, o monitoramento pode ser feito através de indicadores de diferencial de pressão instalados entre estes ambientes e acompanhados e registrados de forma regular pelos funcionários do processo de produção<sup>9,29,33</sup> ou por instrumentos automáticos<sup>14</sup>.

O diferencial de pressão da CSB deve ser monitorado através do manômetro instalado na própria cabine.

O monitoramento da temperatura e da umidade relativa pode ser realizado através de um termo-higrômetro posicionado na altura do trabalho.

### 9.3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM

A contagem de partícula total em áreas Grau A e C deve ser realizada, no mínimo, uma vez por semana e em cada turno de manipulação. O ensaio deve ser feito em operação e em repouso, e no mesmo dia do monitoramento de partículas viáveis<sup>4</sup>.

O diferencial de pressão, a temperatura e a umidade devem ser medidos diariamente e de forma regular ou contínua durante as atividades<sup>4,5,7,29</sup>.

### 9.4. LOCAL DE AMOSTRAGEM

A contagem de partícula total deve ser realizada em áreas Grau A e C da área limpa. Em área Grau D, não é exigida amostragem<sup>4</sup>.

Os locais considerados de maior risco de contaminação para o produto devem ser escolhidos para o monitoramento em operação<sup>4</sup>. No monitoramento em repouso amostrar, no mínimo, 1 ponto dentro do EFU/CSB e 1 ponto na sala adjacente<sup>32</sup>.

As sugestões dos locais para amostragem estão descritos no Apêndice H. Porém, a definição dos locais deve ser estabelecida, preferencialmente, mediante uma análise de risco<sup>4,20</sup>.

### 9.5. MOMENTO DA AMOSTRAGEM

A contagem de partícula total deve ser realizada durante a manipulação (equipamentos ligados e presença de materiais e funcionários). Após o término da manipulação, os funcionários e materiais são retirados da sala. Após o período de recuperação\*, repetir o ensaio com a área em repouso (equipamentos ligados e ausência de materiais e funcionários) a fim de verificar se o sistema atinge os parâmetros de uma área em estado de repouso<sup>4,31</sup>.

A medição do diferencial de pressão e temperatura deve ser feita durante a manipulação<sup>4,7,33</sup>.

---

\* Período de recuperação - tempo (15 a 20 minutos) para área limpa restabelecer a classificação do ar para a condição em repouso após a conclusão das operações. Detalhes do ensaio no Apêndice I.

## 9.6. LIMITE MÁXIMO

Ensaio	Diâmetro da partícula	Limites máximos					
		Em repouso <sup>4</sup>			Em operação <sup>4</sup>		
		Grau A	Grau C	Grau D	Grau A	Grau C	Grau D
Contagem de partícula total	≥ 0,5 µm	3.520	352.000	3.520.000	3520	3.520.000	ND
	≥ 5 µm	20	2.900	29.000	20	29.000	ND
Diferencial de pressão	Não há um valor específico. A diferença de pressão entre duas áreas pode variar de 5-20 Pa <sup>7</sup>						
Temperatura e umidade	Temperatura entre 21-24 °C e umidade relativa entre 40-60% <sup>1</sup>						

ND – não Definido

Nesse estudo, os limites de alerta para partícula total em operação não foram estabelecidos, pois esse tipo de amostragem não fazia parte da rotina de monitoramento.

## **10. CONDUTAS A SEREM REALIZADAS AO EXCEDER O LIMITE DE ALERTA NO MONITORAMENTO DE PARTÍCULA TOTAL E VIÁVEL DO AR, DA SUPERFÍCIE E DO FUNCIONÁRIO.**

- Comunicar o resultado por escrito aos setores envolvidos (quimioterapia ou nutrição parenteral e chefia da Seção de Farmácia)<sup>20</sup>;
- Comunicar o resultado aos funcionários da manipulação e questionar sobre condutas durante a manipulação (ex: avaliar os procedimentos realizados pelo funcionário, comportamento durante a execução, nível de sobrecarga e nível de paramentação)<sup>4,20</sup>;
- Avaliar os resultados do monitoramento ambiental em operação e em repouso (partícula total, diferencial de pressão, temperatura, umidade, partícula viável do ar, superfície, mão e vestuário do manipulador);
- Manter a rotina estabelecida no plano de monitoramento ambiental<sup>8</sup>;
- Inserir os dados em uma planilha de análise de tendência do monitoramento ambiental<sup>8</sup>.

## **11. CONDUTAS A SEREM REALIZADAS AO EXCEDER O LIMITE MÁXIMO (DESVIO) NO MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS DO AR, DOS FUNCIONÁRIOS E DAS SUPERFÍCIES.**

### **11.1. Ações comuns:**

- Comunicar o desvio por escrito aos setores envolvidos (quimioterapia ou nutrição parenteral e chefia da Seção de Farmácia)<sup>4,20</sup>;
- Identificar a(s) espécie(s) do(s) micro-organismos nos isolados e verificar a ocorrência da mesma espécie em outro ensaio para correlacionar com a fonte de contaminação<sup>20</sup>;
- Avaliar o micro-organismo quanto à possível fonte de contaminação (humana ou ambiental)<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados do monitoramento ambiental em operação e em repouso realizados no dia do desvio (partícula total, diferencial de pressão, temperatura, umidade, partícula viável do ar, superfície, mão e vestuário do manipulador);
- Avaliar os resultados de esterilidade dos meios de cultura empregados no dia do desvio<sup>4</sup>;
- Verificar o laudo do controle microbiológico dos agentes empregados na antisepsia das mãos, na limpeza e desinfecção da superfície interna do EFU/CSB e dos agentes empregados na lavagem e desinfecção dos materiais;
- Comunicar o resultado aos funcionários envolvidos no desvio e questionar/avaliar sobre<sup>4,20</sup>.
  - ✓ a ocorrência de alguma situação atípica durante a manipulação;

- ✓ as condutas nos processos de limpeza, desinfecção, paramentação, antissepsia, fluxo de materiais e condutas assépticas durante a manipulação;
- Investigação inconclusiva do desvio (não identificação de uma causa) exige acompanhamento rigoroso do funcionamento do sistema de filtragem e dos processos, e aumento dos pontos e frequência de amostragem a fim de identificar a fonte de contaminação e obtenção de dados que garantam que a área esteja dentro dos limites especificados<sup>4</sup>;
- Inserir os dados em uma planilha de análise de tendência do monitoramento ambiental<sup>8</sup>;
- Reconciliar e registrar todos os dados das condutas em um relatório de desvio<sup>4</sup>.

## **11.2. Ações específicas:**

### **11.2.1. Desvio na luva ou no vestuário do manipulador e do funcionário de suporte.**

- Avaliar o grau de contaminação na luva e no vestuário do manipulador e o impacto no produto<sup>20</sup>;
- Realizar limpeza rigorosa do interior do EFU/CSB;
- Avaliar o resultado dos outros funcionários amostrados no mesmo dia do desvio<sup>20</sup>;
- Questionar ao funcionário quanto à integridade e o estado da luva no momento da amostragem (presença de furo, tempo de uso da luva na manipulação, frequência de troca das luvas no período da manipulação)<sup>20</sup>;
- Avaliar o certificado de esterilidade do vestuário. Caso a contaminação no vestuário seja excessiva, avaliar a qualidade do material do vestuário e o seu uso de

foma incorreta (técnica errada de paramentação, troca insuficiente do vestuário e reaproveitamento do vestuário)<sup>15</sup>;

- Avaliar os procedimentos de antisepsia das mãos e colocação das luvas e do vestuário pelo funcionário em investigação<sup>20,29</sup>;
- Realizar treinamento teórico com o funcionário.

#### **11.2.2. Desvio na superfície interna do EFU/CSB ou dos materiais inseridos nestes equipamentos (Grau A)**

- Promover a limpeza rigorosa da superfície do EFU/CSB com o agente desinfetante empregado na rotina até a identificação da espécie isolada ser concluída. Caso o micro-organismo seja formador de esporo, empregar na limpeza um agente esporocida<sup>11</sup>. Caso a contaminação seja isolada, reamostrar a área nos pontos estabelecidos no plano de monitoramento após a limpeza rigorosa;
- Caso a contaminação seja alta e associada a outros desvios em investigação, o equipamento deve ser interditado até a resolução do problema;
- Avaliar o grau de contaminação da superfície e o impacto no produto<sup>20</sup>;
- Avaliar o resultado microbiológico do desinfetante utilizado na limpeza e desinfecção da superfície interna dos equipamentos e dos materiais<sup>20</sup>;
- Avaliar os procedimentos de limpeza e desinfecção da superfície interna dos equipamentos e materiais;
- Avaliar o nível de sobrecarga do funcionário no dia do desvio.

### **11.2.3. Desvio na superfície dos mobiliários e dos materiais na sala de manipulação e antecâmara (Grau C)**

- Promover a limpeza rigorosa na superfície com o agente desinfetante empregado na rotina até a identificação da espécie ser concluída. Caso o micro-organismo seja formador de esporo, empregar na limpeza um agente esporocida<sup>11</sup>;
- Avaliar o preparo e a validade dos agentes desinfetantes empregados na limpeza e desinfecção das superfícies da área limpa<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados dos controles microbiológicos dos agentes desinfetantes empregados na limpeza e desinfecção das superfícies da área em investigação<sup>20</sup>;
- Avaliar a ocorrência de alguma situação atípica durante a manipulação e as condutas nos processos de limpeza, desinfecção, paramentação, antissepsia, fluxo de materiais e pessoas, condutas assépticas durante a manipulação e atividades desempenhadas no dia do desvio<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados do monitoramento de partícula total e viável do ar;
- Caso seja comprovado ou haja suspeita da contaminação ser proveniente de condutas inadequadas realizadas pelo funcionário, este deve ser convocado para treinamento teórico das práticas e condutas de técnicas assépticas;
- Investigação inconclusiva do desvio (não identificação de uma causa) exige acompanhamento rigoroso do funcionamento do sistema de filtração e dos processos, e aumento dos pontos e frequência de amostragem a fim de identificar a fonte de contaminação e obtenção de dados que garantam que a área esteja dentro dos limites especificados<sup>4</sup>.

#### **11.2.4. Desvio de partícula viável no monitoramento após a limpeza e desinfecção da área limpa**

- Promover limpeza rigorosa da superfície, sob supervisão, com o agente desinfetante empregado na rotina até a identificação da espécie ser concluída. Caso o micro-organismo seja formador de esporo, empregar na limpeza um agente esporocida<sup>11</sup>. Caso a contaminação seja isolada, reamostrar a área nos pontos estabelecidos no plano de monitoramento;
- Após a limpeza, deve ser realizada a reamostragem das superfícies. Deve-se aumentar os pontos de amostragem a fim de garantir maior confiabilidade nos resultados. Reamostrar os mesmos pontos do monitoramento ambiental e mais alguns pontos extras por três dias consecutivos<sup>4,11</sup>;
- Caso a contaminação seja alta e associada a outros pontos de amostragem com desvios a área deve ficar interditada até o resultado final do controle microbiológico e a resolução do problema;
- Avaliar o preparo e a validade dos agentes desinfetantes empregados na limpeza e desinfecção das superfícies da área limpa<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados dos controles microbiológicos dos agentes desinfetantes empregados na limpeza e desinfecção das superfícies da área em investigação<sup>20</sup>;
- Avaliar a qualidade dos materiais (mops e compressas) utilizados na limpeza e desinfecção das superfícies da área em investigação<sup>29</sup>;
- Avaliar a ocorrência de alguma situação atípica (ex.: manutenção) antes da realização da limpeza e desinfecção<sup>20</sup>;
- Avaliar as condutas nos processos de limpeza e desinfecção, paramentação e nível de treinamento dos funcionários<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados do monitoramento de partícula total e viável do ar;

- Caso seja comprovado ou que haja suspeita da contaminação ser proveniente de condutas inadequadas realizadas pelo funcionário durante a desinfecção, este deve ser convocado para treinamento teórico e prático<sup>20</sup>.

#### 11.2.5. Desvio de partícula viável no ar do EFU/CSB (Grau A)

- Interditar o EFU/CSB;
- Promover limpeza rigorosa no interior do EFU/CSB com agente desinfetante empregado na rotina até a identificação da espécie ser concluída. Caso o micro-organismo seja formador de esporo, empregar na limpeza um agente esporocida<sup>11</sup>;
- Realizar ensaios\* para avaliar os parâmetros do EFU/CSB;
- Após a realização dos ensaios, limpar novamente o interior do EFU/CSB;
- Após a limpeza, o EFU/CSB deve ser reamostrado. Deve ser realizada a reamostragem de partículas viáveis do ar pelo método ativo e passivo e da superfície interna do equipamento. Deve-se aumentar os pontos de reamostragem a fim de garantir maior confiabilidade nos resultados. Reamostrar os mesmos pontos do monitoramento ambiental e mais alguns pontos extras por três dias consecutivos<sup>11</sup>. O equipamento deve ficar interditado até o resultado final do controle microbiológico;
- Avaliar o grau de atividade dos funcionários no dia do desvio<sup>20</sup>;
- Verificar os certificados de calibração dos equipamentos<sup>4</sup> e a esterilidade das tampas dos amostradores utilizados para a amostragem do ar no dia do desvio;
- Avaliar a ocorrência de alguma interrupção no sistema HVAC<sup>20</sup>;

---

\* Ensaio - contagem de partícula total, velocidade e uniformidade do fluxo de ar (*downflow, inflow, airflow*), pressão de saturação dos filtros e integridade dos filtros absolutos<sup>20,21</sup>.

\*\* Requalificação – contagem de partícula total, velocidade e uniformidade do fluxo de ar (*downflow, inflow, airflow*), vazamento do filtro instalado, visualização do sentido do fluxo de ar, temperatura e umidade<sup>2</sup>.

- Verificar o fluxo de ar do EFU/CSB<sup>20</sup>;
- Verificar a data da última troca do pré-filtro, do filtro absoluto e da requalificação dos equipamentos\*;
- Avaliar os resultados da última requalificação do equipamento.
- Avaliar os procedimentos de limpeza e desinfecção e a eficiência do agente desinfetante utilizado<sup>20</sup>;
- Revisar os registros de treinamento das práticas de limpeza e desinfecção<sup>20</sup>;
- Investigação inconclusiva do desvio (não identificação de uma causa) exige acompanhamento rigoroso do funcionamento do sistema de filtragem e dos processos, e aumento dos pontos e frequência de amostragem a fim de identificar a fonte de contaminação e obtenção de dados que garantam que a área esteja dentro dos limites especificados<sup>4</sup>.

#### **11.2.6. Desvio de partícula viável no ar da sala de manipulação, antecâmara e sala de higienização (Grau C e D)**

- Interditar a sala;
- Retirar todos os materiais da sala em investigação e promover limpeza rigorosa (superfície da infraestrutura e mobiliários) com o agente desinfetante empregado na rotina até a identificação da espécie isolada ser concluída. Caso o micro-organismo seja formador de esporo, empregar na limpeza um agente esporocida<sup>11</sup>;
- Se a área interditada for a sala de manipulação, o EFU/CSB inserido nessa sala também deve passar pelo mesmo procedimento realizado na sala;

---

\* Requalificação dos equipamentos – testes necessários para assegurar que o equipamento tenha sido projetado, construído e opere dentro dos limites de aceitação de acordo com as regras de Boas Práticas de Fabricação. A qualificação deve ser executada em operação e em repouso (ANVISA). Os ensaios de requalificação estão descritos nos Apêndices H e I.

- Realizar ensaios para avaliar os parâmetros do sistema HVAC\* da sala investigada;
- Após os ensaios, realizar novamente a limpeza e desinfecção da sala em investigação. Se a sala em investigação for a de manipulação, os EFU/CSB dessa sala também devem ser limpos e desinfetados;
- Após a limpeza, a sala e os EFU/CSB devem ser reamostrados. Deve ser realizada a reamostragem de partículas viáveis do ar pelo método ativo e passivo e das superfícies. Deve-se aumentar os pontos de reamostragem a fim de garantir maior confiabilidade nos resultados. Reamostrar os mesmos pontos do monitoramento ambiental e mais alguns pontos extras por três dias consecutivos<sup>11</sup>. A sala deve ficar interditada até o resultado final do controle microbiológico e resolução do problema;
- Verificar os certificados de calibração dos equipamentos<sup>4</sup> e a esterilidade das tampas dos amostradores utilizados para a amostragem do ar no dia do desvio;
- Avaliar o grau de atividade dos funcionários no dia do desvio<sup>20</sup>;
- Avaliar a ocorrência de alguma interrupção no sistema HVAC<sup>20</sup>;
- Verificar os resultados do monitoramento do diferencial de pressão entre as salas (fluxo de ar)<sup>20</sup>;
- Avaliar os resultados da última requalificação da área limpa\* ;
- Avaliar os procedimentos de limpeza e desinfecção e a eficiência do agente desinfetante utilizado<sup>20</sup>;
- Revisar os registros de treinamento das práticas de limpeza e desinfecção<sup>20</sup>.

---

\*Parâmetros do sistema HVAC – contagem das partículas totais, diferencial de pressão, temperatura, umidade, volume de ar, número de trocas de ar da área, integridade dos filtros absolutos da área limpa<sup>20</sup>.

\*Requalificação da área limpa- ensaios realizados para a certificação do desempenho do sistema HVAC. Ver ensaios Apêndice I e H.

### **11.2.7. Desvio no monitoramento de partícula total em operação**

- Interromper as atividades;
- Verificar o número de pessoas na área no momento da amostragem<sup>13</sup>;
- Verificar o diferencial de pressão;
- Verificar e corrigir as condutas (posições e movimentos dos funcionários) no momento da amostragem<sup>13</sup>;
- Reiniciar a amostragem;
- Verificar os resultados do monitoramento de partícula viável do ar e da superfície em operação e em repouso.

### **11.2.8. Desvio no diferencial de pressão, temperatura e umidade**

- Interromper as atividades até o restabelecimento dos parâmetros ideais de trabalho;
- Acionar a equipe/empresa responsável pela manutenção da área limpa.

### **11.3. Condutas em caso de reincidência do desvio na luva ou no vestuário do manipulador e do funcionário de suporte**

- Comunicar o resultado ao funcionário envolvido no desvio<sup>4,20</sup>;
- Convocar o funcionário em investigação para requalificação\*;
- Após a requalificação, acompanhar e avaliar as condutas do funcionário nos processos de limpeza, desinfecção, paramentação, antissepsia, fluxo de materiais e condutas assépticas durante a manipulação<sup>4</sup>.

---

\* Requalificação do funcionário – retreinamento teórico e prático das condutas assépticas durante as atividades de manipulação, cuidado com a higiene pessoal, revalidação dos procedimentos de antissepsia das mãos, calçar as luvas, paramentação e media-fill<sup>20,29</sup>

### 11.3.1. Condutas no caso de reincidência do desvio no monitoramento de partículas viáveis do ar e da superfície e de partículas totais

- Avaliar a espécie do micro-organismo quanto à resistência ao agente desinfetante empregado na rotina da limpeza e desinfecção;
- Empregar agente desinfetante adequado para eliminar a espécie resistente<sup>10</sup>;
- Revisar os procedimentos de limpeza e desinfecção da área<sup>20</sup>;
- Comunicar o resultado aos funcionários envolvidos no desvio e avaliar as condutas nos processos de limpeza, desinfecção, paramentação, antissepsia, fluxo de materiais e condutas assépticas durante a manipulação<sup>4,20</sup>;
- Avaliar a integridade da infraestrutura da área limpa (pintura descascando, rachaduras no teto, paredes e chão)<sup>20</sup>;
- Verificar a data da última limpeza dos componentes da unidade de tratamento do ar (UTA);
- Avaliar a troca dos filtros da UTA (Filtro grosso, fino e absoluto);
- Verificar a data da última limpeza dos dutos de insuflamento de ar;
- Caso permaneça o desvio, realizar os ensaios para a requalificação da área limpa\* e avaliar possibilidade de troca dos filtros absolutos.

---

\*Ensaio para a requalificação da área limpa – Contagem de partícula total, velocidade e uniformidade do fluxo de ar, diferencial de pressão, vazamento do filtro instalado, visualização do sentido do fluxo de ar, teste de recuperação, integridade da contenção da área limpa, temperatura e umidade<sup>2</sup>.

## 12. REFERÊNCIAS

1. ABNT NBR 7256. **Tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS)** – Requisitos para projeto e execução das instalações. 2005
2. ABNT NBR ISO 14644 – **Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 3: Método de ensaio**. 2009.
3. ANDON, B.M. Active Air vs. Passive Air (Settle Plate) Monitoring in Routine Environmental Monitoring Programs. **PDA J Sci and Tech.**, v. 60, n. 6, p. 350-355, 2006.
4. ANVISA. Guia de qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica. 1 ed. Brasília, DF, mar. 2013. 56p.
5. \_\_\_\_\_. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 abr. 2010. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html). Acesso em: 10 maio 2015.
6. \_\_\_\_\_. RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 out. 2007. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/res0067\\_08\\_10\\_2007.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/res0067_08_10_2007.html). Acesso em: 08 mar. 2015.
7. EUROPEAN COMMISSION. **EU Guidelines to Good Manufacturing Practice: Medicinal Products for Human and Veterinary Use**. Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products. Brussell, 2008. v.4.
8. FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.
9. FDA. **Guidance for Industry: Sterile Drug products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice**. September 2004.
10. GUIDANCE on the Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products Produced by Terminal Sterilization. Tokyo, 2012. Disponível em: <https://www.pmda.go.jp/files/000160794.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2016

11. HALLS, H. Microbiological Environmental Monitoring. In: \_\_\_\_\_. **Microbiological Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms.** Florida. 2003. Cap. II., p. 23-51.
12. ISO. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part: 1: Classification of air cleanliness. Dec. 2015a
13. ISO. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part 2: Monitoring to provide evidence of cleanroom performance related to air cleanliness by particle concentration. Dec. 2015b.
14. ISO. **ISO 14644** – Cleanrooms and Associated Controlled Environments – Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1. Sep. 2000.
15. **ISO 14698** – Cleanrooms and associated controlled environments – Biocontamination control – Part 1: General principles and methods. Sept. 2003.
16. JAPANESE PHARMACOPEIA. 16 ed. Tokyo, 2011.p. 2211- 2215.
17. LOPOLITO, P.; BARTNETT, C.; POLARINE, J. **Control Strategies for Fungal Contamination in Cleanrooms**, 2007. Disponível em: <<http://www.cemag.us/article/2007/09/control-strategies-fungal-contamination-cleanrooms>>. Acesso em: 15 jan. 2017
18. PACHECO, F.L.C.; PINTO, T.J.A. The bacterial diversity of Pharmaceutical clean rooms analyzed by the fatty acid methyl ester technique. **PDA J Sci and Tech.**, v. 64, p. 156-166, 2010.
19. PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **J Hosp Infect.**, v. 46, p. 241-256, 2000.
20. PDA. Technical Report N° 13 (Revised). Fundamentals of an Environmental Monitoring Program. 2014.
21. PINTO, T.S. A; KANEKO, T.M; PINTO, A.F. **Controle de Produtos Estéreis: Ênfase nos Processos Assépticos.** In: \_\_\_\_\_. Controle Biológico de qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. São Paulo. 4 ed., 2015. Cap. VII. p. 385-446.

21. SANDLE, T. Application of quality risk management to set viable environmental monitoring frequencies in biotechnology processing and support areas. **PDA J Sci and Tech.**, v. 66, n. 6, p. 560-579, 2012.
22. SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: Types, trends and patterns. **PDA J Sci and Tech.**, v. 65, p. 392-403, 2011.
23. SANDLE, T. In vitro fungicidal activity of biocides against pharmaceutical Environmental fungal isolates. **J Appl Microbiol.**, v. 117, p.1267-1273, 2014b.
24. SHINTANI, H. Validation studies for microbial contamination and control of contaminants. **Biocontrol Sci.**, v. 20, n. 3, p. 161 – 170, 2015a.
25. USP. **Disinfectants and Antiseptics**, 39 ed. Rockville:The United States Pharmacopeial Convencional, 2016a. 1 CD-ROM.
26. USP. **Microbiological Control And Monitoring of Aseptic Processing Environments**.39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convencional, 2016b. 1 CD-ROM.
27. USP. **Microbiological Evaluation of Clean Rooms and other controlled Environments**.39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convencional, 2011.
28. USP. **Pharmaceutical Compounding – Sterile Preparations**. 39 ed. Rockville:The United States Pharmacopeial Convencional, 2016c. 1 CD-ROM.
29. WHYTE, W. A Cleanroom Contamination Control. **EJPPS.**, v. 7, n. 2, p. 55-61, 2002.
30. WHYTE, W. **Cleanroom Technology**. Fundamental of Design, Testing and Operation. London, 2003.
31. WHO. **Environmental Monitoring of clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities**: Points to consider for manufacturers of human vaccines. Geneva, 2012. Disponível em:  
<[http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/env\\_monitoring\\_cleanrooms\\_final.pdf](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2015.

32. WHO. **Good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products.** WHO Technical Report Series, n. 961, Annex 6, 2011.  
Disponível em:  
<[http://apps.who.int/prequal/info\\_general/documents/TRS961/TRS961\\_Annex6.pdf](http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/TRS961/TRS961_Annex6.pdf)> Acesso em: 05 jul. 2015.

## APÊNDICE A

Monitoramento de partículas viáveis em superfície em operação					
Local de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem	
<b>Luva</b>	Manipulador	A	5 dedos de cada mão com luva	<b>Imediatamente</b> após o término do processo de manipulação	Uma vez por semana
	Funcionário de suporte	C	5 dedos de cada mão com luva		
<b>Vestuário</b>	Manipulador	A	1 ponto no antebraço direito <sup>21</sup>	<b>Imediatamente</b> após o término do processo de manipulação	Uma vez por semana
		C	1 ponto no antebraço esquerdo <sup>21</sup>		
	Funcionário de suporte*	C	1 ponto no centro do tórax <sup>21*</sup> 1 ponto próximo a axila <sup>11</sup>		
<b>EFU/CSB****</b>	Superfície interna (Bancada)	A	1 ponto no lado direito da área de trabalho	<b>Imediatamente</b> após o término do processo de manipulação	Uma vez por semana
			1 ponto no lado esquerdo da área de trabalho		
	Materiais		2 itens estéreis** 1 item não estéril***		
<b>Sala de manipulação****</b>	Bancada		1 ponto sobre a bancada próxima ao EFU/CSB	<b>Imediatamente após ou durante</b> o processo de manipulação	Uma vez por semana
	Carrinho de transporte	C/D*****	1 ponto sobre o carrinho de suporte próximo ao EFU/CSB		
	Recipiente de guarda dos F/A e ampolas		2 pontos nas superfícies dos recipientes		
<b>Antecâmara****</b>	Bancada		1 ponto sobre a bancada		

F/A – Frasco-ampola

\*Outros pontos, de menor risco, podem ser amostrados como: zíper, parte posterior da cabeça, cordões e botas<sup>11,21</sup>.

\*\* seringa, equipo, agulha e conexões estéreis;

\*\*\*bolsa de soro, frasco-ampola (F/A), ampola e envase de “lixo”.

\*\*\*\*Não há especificado o número de pontos de amostragem para cada área. A determinação do número de pontos e a localização desses devem ser feitas, preferencialmente, após uma análise de risco dos processos.

\*\*\*\*\* Para sala de manipulação Grau D, foi considerada a mesma frequência de amostragem realizada para sala grau C.

A quantidade de pontos e os locais para amostragem nesse plano atendem à necessidade da área limpa do estudo. Os pontos selecionados para a amostragem não podem ser modificados sem justificativa ou aviso prévio<sup>13</sup>.

## APÊNDICE B

### Monitoramento de partículas viáveis do ar em operação

Local de amostragem*	Tipo de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem
EFU/CSB	Ar (Amostragem ativa)	A	1 ponto dentro do EFU/CSB ao lado da área de trabalho	Durante a manipulação	Uma vez por semana
Sala de manipulação	Ar (Amostragem ativa)	C/D*	2 pontos na sala de manipulação (próximos a face frontal do EFU/CSB)	Durante a manipulação	Uma vez por semana
Antecâmara	Ar (Amostragem ativa)	C	1 ponto		
Sala de Higienização	Ar (Amostragem ativa)	D	Pontos próximos a portas e pass-throughs	Durante a manipulação	Uma vez por mês
Vestiários		D	1 ponto		
EFU/CSB	Ar (Amostragem Passiva) Placas com meio de cultura (90 mm)	A	1 ponto dentro do EFU/CSB ao lado da área de trabalho	Durante a manipulação	Uma vez por semana
Sala de manipulação	Ar (Amostragem Passiva) Placas com meio de cultura (90 mm)	C/D*	2 pontos na sala de manipulação (próximos ao EFU/CSB)		
		C/D*	1 ponto próximo a porta ou pass-through	Durante a manipulação	Uma vez por semana
		C/D*	1 ponto na direção oposta à porta		
Antecâmara		C	1 ponto		
Sala de Higienização	Ar (Amostragem Passiva) Placas com meio de cultura (90 mm)	D	1 ponto	Durante as atividades	Uma vez por mês
Vestiários		D	1 ponto		

\*Para sala de manipulação Grau D, foi considerada a mesma frequência de amostragem realizada para sala Grau C.

Não há definição do número de pontos e locais de amostragem para cada área. A determinação do número de pontos e a localização desses devem ser feitos, preferencialmente, após uma avaliação de risco dos processos. A quantidade de pontos e os locais para amostragem nesse plano atendem à necessidade da área limpa do estudo. Os pontos selecionados para a amostragem não podem ser modificados sem justificativa ou aviso prévio a fim de permitir a comparação dos resultados<sup>13</sup>.

## APÊNDICE C

Monitoramento de partículas viáveis em repouso					
Local de amostragem	Tipo de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem
EFU/CSB	Superfície	A	1 ponto na bancada no centro da área de trabalho	Repouso	Uma vez por semana
Sala de manipulação	Superfície	C/D*	1 ponto sobre a bancada próxima ao EFU/CSB	Repouso	Uma vez por semana
Antecâmara	Superfície	C	1 ponto sobre a bancada	Repouso	Uma vez por semana
EFU/CSB	Ar (Amostragem ativa)	A	1 ponto dentro do EFU/CSB	Repouso	Uma vez por semana
Sala de manipulação	Ar (Amostragem ativa)	C/D*	1 ponto na sala de manipulação (escolher o ponto mais crítico amostrado em operação)	Repouso	Uma vez por semana
Sala de Higienização	Ar (Amostragem ativa)	D	Pontos próximos a portas e pass-throughs	Repouso	Uma vez por mês
EFU/CSB	Ar (Amostragem passiva)	A	1 ponto dentro do EFU/CSB	Repouso	Uma vez por semana
Sala de manipulação	Ar (Amostragem passiva)	C/D*	1 ponto na sala de manipulação (escolher o ponto mais crítico amostrado em operação)	Repouso	Uma vez por semana
Sala de Higienização	Ar (Amostragem passiva)	D	Pontos próximos a portas e pass-throughs	Repouso	Uma vez por mês

\*Para sala de manipulação Grau D, foi considerada a mesma frequência de amostragem realizada para sala Grau C

Os pontos selecionados para amostragem nesse manual atendem a necessidade da área limpa do estudo. Os pontos selecionados para a amostragem não podem ser modificados sem justificativa ou aviso prévio a fim de permitir a comparação dos resultados<sup>13</sup>.

## APÊNDICE D

### Monitoramento de partículas viáveis das superfícies após a limpeza e desinfecção da área limpa

Tipo de amostragem	Local de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem
Superfície	EFU/CSB	A	2 pontos na <b>bancada interna</b>	Após a desinfecção	Uma vez por semana
Superfície	Sala de manipulação	C/D*	1 ponto na <b>maçaneta</b>		
Superfície	Sala de manipulação	C/D*	1 ponto na <b>porta</b>		
Superfície	Sala de manipulação	C/D*	1 ponto na <b>parede</b>	Após a desinfecção	Uma vez por semana
Superfície	Sala de manipulação	C/D*	1 ponto na <b>bancada</b> próxima ao EFU/CSB		
Superfície	Sala de manipulação	C/D*	1 ponto na <b>cadeira</b> em frente ao EFU/CSB		

\*Para sala de manipulação Grau D, foi considerada a mesma frequência de amostragem realizada para sala Grau C.

Os pontos selecionados para amostragem nesse manual atendem a necessidade da área limpa do estudo.

Os pontos selecionados para a amostragem não podem ser modificados sem justificativa ou aviso prévio a fim de permitir a comparação dos resultados<sup>13</sup>.

## APÊNDICE E

**Tabela com o número de pontos para amostragem de partículas totais em área  
limpa**

Área menor ou igual da área limpa (m <sup>2</sup> )	Número mínimo de amostragem
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13
72	14
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
636	26
1000	27
> 1000	Fórmula da ISO 14644-1, 2015

fonte: ISO (2015a)

## APÊNDICE F

### Ensaio para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.

Ensaio	Objetivo	Classificação da área	Intervalo máximo sugerido para a realização dos ensaios (ISO 14644-2 de 2000)	Descrição do Ensaio	Estado de ocupação da área
Contagem de partícula total	Especificar a concentração de partículas de diâmetro no intervalo de 0,5µm a 5 µm.	Grau A e B (≤ ISO classe 5)	6 meses	Amostrar com contador de partículas discretas (CPD) o volume mínimo de 2 Litros de ar em um tempo mínimo de 1 minuto por ponto. O ponto de amostragem deve ser a 30 cm da área do trabalho. Posicionar a abertura da sonda do CPD no sentido do fluxo de ar (fluxo unidirecional) ou na posição vertical (fluxo não unidirecional). Ajustar a vazão do ar do CPD e selecionar os limites de diâmetro da partícula a ser medido. O tubo de ligação entre a sonda e o sensor do CPD deve ser o mais curto possível.	Repouso, construído e em operação
		Grau C e D (> ISO classe 5)	12 meses		
Volume de ar (nº de trocas de ar)	Realizado em áreas limpas de fluxo de ar não unidirecional a fim de verificar o volume de ar (vazão de insuflamento) insuflado por unidade de tempo.	Grau B, C e D (> ISO classe 5)	12 meses	Utilizado para calcular o número de trocas de ar por tempo. A medição é realizada próximo à face dos filtros terminais ou nos dutos de insuflamento. A vazão é medida utilizando uma coifa com medidor de fluxo. A abertura da coifa deve cobrir totalmente o filtro ou difusor e a face da coifa deve ser apoiada em uma superfície plana.	Repouso, construído e em operação
Velocidade e uniformidade do fluxo de ar	Realizado em áreas limpas de fluxo de ar unidirecional a fim de verificar a velocidade e a uniformidade do fluxo de ar.	Grau A (≤ ISO classe 5)	12 meses	A medição da velocidade é realizada próximo à face dos filtros terminais. A área deve ser dividida em uma grade de áreas iguais e a velocidade medida em um plano perpendicular ao fluxo de ar. A medição da uniformidade da velocidade do ar não deve ser realizada próxima à obstáculos (equipamentos e bancadas) a fim de evitar variações do fluxo de ar.	Repouso, construído e em operação
Diferencial de pressão	Verificar a capacidade da instalação em manter as diferenças de pressão especificadas entre as instalações e seus arredores.	Todas as classificações de área	12 meses	Realizado com um micromanômetro ou manômetro. O ensaio deve ser realizado após a área ter atendido os critérios de aceitação para velocidade ou volume do fluxo de ar e balanceamento da instalação. O procedimento deve ser realizado com as portas fechadas e a partir da área mais interna em direção as adjacentes. Em seguida, deve-se abrir todas as portas e verificar o diferencial de pressão. Fechar a porta e confirmar se o diferencial de pressão retorna ao valor original. A medição deve ser feita sempre nos mesmos pontos e próxima ao centro da área a ser medida e distante das portas e pass-throughs, para não sofrer influência da pressão local no ponto da medição.	Repouso, construído e em operação

fonte: elaborado pela autora a partir da ABNT (2009), ISO (2000), ISO (2015a) e ANVISA (2013)

Ensaio	Resultados aceitáveis			
	Em repouso		Em operação	
	Grau A	Grau C	Grau A	Grau D
Limite máximo de contagem de partículas total (nº máximo de partículas/m³)	> 0,5 mm: 3520 > 5 mm: 20	> 0,5 mm: 352.000 > 5 mm: 2.900	> 0,5 mm: 3520 > 5 mm: 20	Não definido
Volume de ar (nº de trocas de ar por hora)	Até 600	Aproximadamente 100	Até 600	Mínimo de 20
Velocidade e uniformidade do fluxo de ar	0,36-0,54 m/s	—	0,36-0,54 m/s	—
Diferencial de pressão	Não há um valor específico. A diferença de pressão entre duas áreas pode variar de 5-20 Pa.			

fonte: elaborado pela autora a partir da ABNT (2009), ISO (2015a) e ANVISA (2013).

## APÊNDICE G

### Ensaio para comissionamento, qualificação e requalificação de uma área limpa de produtos estéreis farmacêuticos.

Ensaio	Objetivo	Classificação da área	Intervalo máximo sugerido para a realização do ensaio (ISO 14644-2 de 2000)	Intervalo estabelecido nos GBP fabricação*	Descrição do Ensaio	Estado de ocupação da área
Vazamento do filtro instalado	Verificar se o sistema de filtragem final com filtro absoluto está instalado corretamente. Verificar se há furos e danos no meio filtrante, selante, moldura do filtro, vedação, quadros de fixação e estrutura de sustentação.	Grau A e B	24 meses	6 meses	Introdução de uma concentração de aerossol de desafio (10-100 mg/m <sup>3</sup> ) antes dos filtros e verificação desse aerossol imediatamente após os filtros, dutos e estrutura de sustentação. Não é um ensaio de eficiência do filtro individual. O ensaio de velocidade do fluxo de ar deve ser realizado antes. É utilizado para medição um fotômetro de aerossol ou um CPD. Deve ser realizado para comissionamento, ensaio de qualificação e requalificação ou substituição dos filtros finais.	Repouso e construído.
		Grau C e D	24 meses	Não definido		
Visualização do sentido do fluxo de ar	Verificar se o sentido do fluxo de ar e sua uniformidade estão em conformidade com o projeto e as especificações de desempenho.	Todas as classes	24 meses	12 meses ou sempre que for necessário	Realizado através do uso de filamento, partículas indicadoras, técnicas de processamento de imagem ou distribuição das velocidades medidas. O procedimento não pode ter interferência dos operadores no padrão do fluxo de ar. O fluxo de ar pode ser influenciado pelo diferencial de pressão, velocidade do ar e temperatura.	Repouso e construído
Recuperação	Determinar se a instalação é capaz de retornar a uma classificação de ar, dentro de um tempo estabelecido, após exposição a uma geração de partículas em suspensão no ar, como desafio.	Não recomendado para fluxo unidirecional e área Grau D	24 meses	12 meses ou sempre que for necessário	É utilizado aerossol artificial para gerar uma concentração inicial de partículas 100 vezes maior que a classificação da área limpa. A medição é feita a cada 1 min. Quando a concentração de partículas alcançar o nível esperado da classificação da área, registrar o tempo de recuperação.	Repouso e construído.
Integridade da contenção (vazamento) da área limpa	Determinar se há penetração na área limpa de ar não filtrado proveniente de áreas adjacentes não controladas através das juntas, passagem de portas e forros pressurizados.	Todas as classes	24 meses	Não definido	É utilizado aerossol para gerar uma concentração de partículas 103 vezes maior que a concentração da área limpa e no mínimo 3,5 x 10 <sup>6</sup> partículas/m <sup>3</sup> , no tamanho da partícula a ser medida. Verificar o vazamento por varredura no interior da área, a uma distância não maior que 5 cm das juntas de construção, trincas ou frestas, com velocidade de varredura de 5 cm/s. Deve ser realizado após qualquer atividade que possa danificar o filtro de alta eficiência.	Repouso e construído.
Temperatura e umidade	Demonstrar a capacidade do sistema de tratamento de ar da instalação em manter os níveis de temperatura e de umidade do ar dentro dos limites de controle.	Todas as classificações de área	Não especificado	Diariamente	Realizado após a conclusão do ensaio de uniformidade da vazão do ar e do ajuste dos controles do sistema de ar condicionado. A temperatura deve ser medida no mínimo em um ponto de medição para cada área de temperatura controlada. O sensor deve ser posicionado na altura do trabalho e o tempo de medição deve ser de no mínimo 5 min. com valor registrado pelo menos a cada minuto. .	Repouso e construído e em operação.

fonte: elaborado pela autora a partir da ABNT (2009), ISO (2000) e ANVISA (2013)

Ensaio	Resultados aceitáveis
Vazamento do filtro instalado	Leitura da medição deve ser menor que 0,01% da concentração inicial de aerossol introduzida no filtro.
Visualização do sentido do fluxo de ar	Não se aplica.
Recuperação	15-20 min
Integridade da contenção	Método utilizando o equipamento fotômetro - leitura menor que 0,01% com fotômetro ajustado em 0,1% não indica vazamento. Método utilizando o equipamento CPD - leitura com concentração menor que 0,01 vezes da concentração de aerossol medida ao redor da área limpa
Temperatura e umidade	A temperatura deve estar entre 21-24 ° C e umidade relativa entre 40-60%.

fonte: elaborado pela autora a partir da ABNT (2005), ABNT (2009), European Commission (2008) e WHO (2011)

## APÊNDICE H

Monitoramento de partículas totais, diferencial de pressão, temperatura e umidade em operação						
Tipo de amostragem	Ferramenta	Local de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem
Partículas totais	Amostrador ativo	EFU/CSB	A	1 ponto	Durante a manipulação	Uma vez por semana
		Sala de manipulação	C/D	Os mesmos pontos realizados no ensaio da requalificação semestral*		
Diferencial de pressão	Manômetro	EFU/CSB	A	EF/CSB	Três vezes por dia	Todos os dias
		Sala de manipulação	C	Entre a sala de manipulação e a antecâmara		
Temperatura e umidade	Termo-higrômetro	Em todas as áreas classificadas	A, C e D	-----	Três vezes por dia	Todos os dias

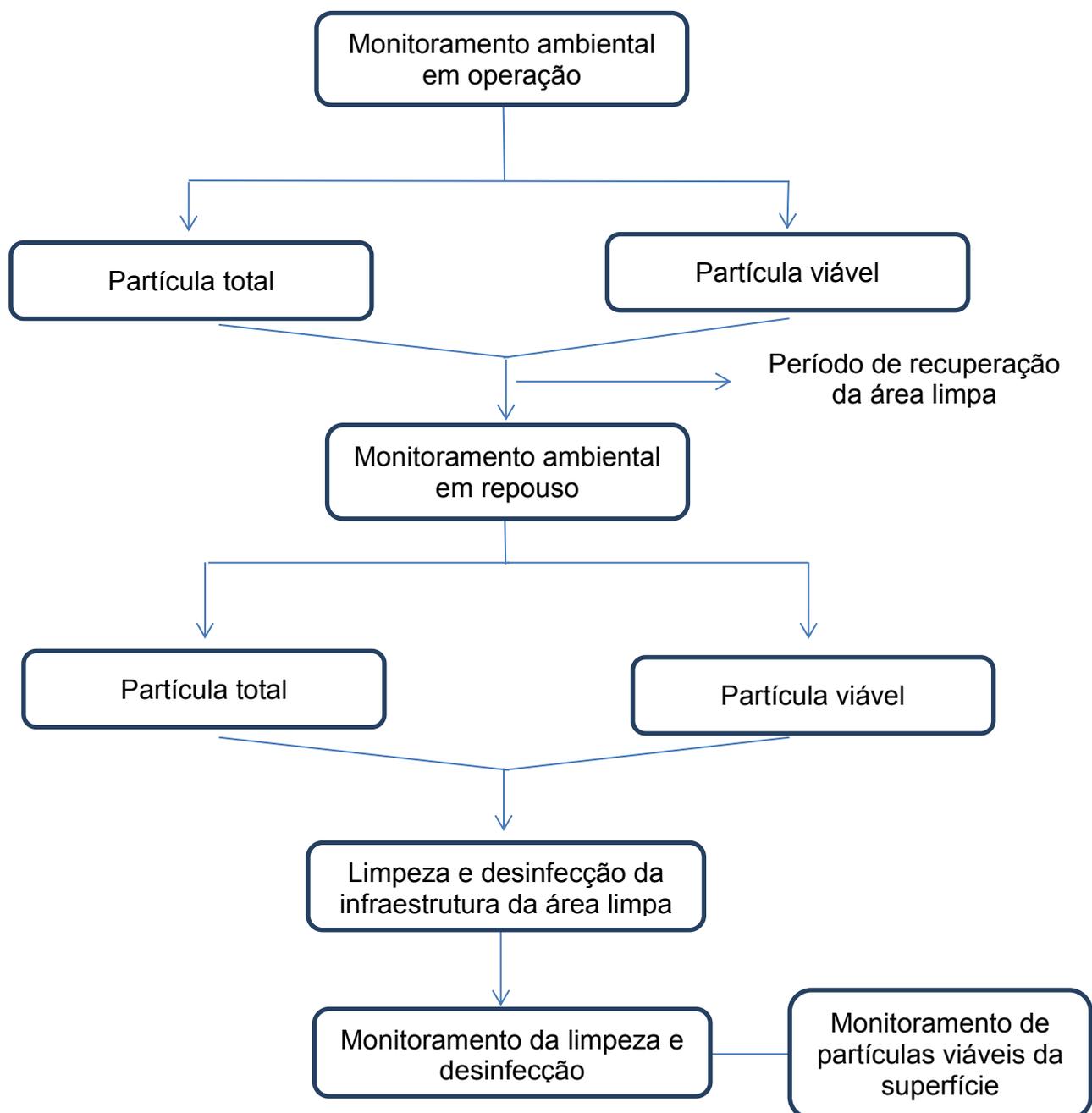
Monitoramento de partículas totais em repouso						
Tipo de amostragem	Ferramenta	Local de amostragem	Grau da área	Ponto de amostragem	Momento da amostragem	Frequência mínima de amostragem
Partículas totais	Amostrador ativo	EFU/ CSB	A	1 ponto	Repouso	Uma vez por semana
Partículas totais	Amostrador ativo	Sala de manipulação	C	Escolher 1 ponto realizado em operação e considerado o mais crítico para o processo	Repouso	Uma vez por semana

Os pontos selecionados para a amostragem não podem ser modificados sem justificativa ou aviso prévio a fim de permitir a comparação dos resultados<sup>13</sup>.

\* Requalificação semestral – Ensaio realizado para a certificação do desempenho do sistema HVAC. Ver ensaios Apêndice H e I.

## APÊNDICE I

## Fluxograma do monitoramento ambiental da área limpa em operação e em repouso



fonte: elaborada pela autora