

---

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

---

**GUSTAVO SOARES**

**ANÁLISE DE PERFIL MICROBIOLÓGICO EM  
AMBIENTE PRODUTIVO FARMACÊUTICO DE  
MEDICAMENTOS NÃO ESTÉREIS**



Rio Claro  
2020

GUSTAVO SOARES

ANÁLISE DE PERFIL MICROBIOLÓGICO EM AMBIENTE  
PRODUTIVO FARMACÊUTICO DE MEDICAMENTOS NÃO  
ESTÉREIS

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Cogo Müller

Coorientador: Me. Dionisio Pedro Amorim Neto

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2020

S676a Soares, Gustavo  
Análise de perfil microbiológico em ambiente produtivo farmacêutico de medicamentos não estéreis / Gustavo Soares. -- Rio Claro, 2020  
25 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientadora: Karina Cogo Müller  
Coorientador: Dionisio Pedro Amorim Neto

1. Microbiologia farmacêutica. 2. Ar Controle de qualidade. 3. Drogas Legislação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda a equipe do departamento de controle de qualidade microbiológico da indústria a qual o trabalho foi desenvolvido, excelentes funcionários, grandes amigos e sempre dispostos a ensinar. Em especial gostaria de agradecer aos gestores Érika e Daniel, pela confiança em me permitir trabalhar com dados da empresa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karina, docente da UNICAMP e responsável pela orientação do projeto. Este trabalho só foi possível devido a sua empatia frente a baixa flexibilidade de horário dos alunos que atuam em indústrias, além de todo o conhecimento técnico-científico agregado. Também sou grato pela coorientação do Me. Dionísio, disponível nos mais diversos horários e essencial no desenvolvimento do projeto, principalmente em sua estruturação.

Agradeço aos meus pais, Raimunda e Gilson, e aos meus irmãos, Jaqueline e Ederson, cada um presente de sua maneira dando suporte uns aos outros.

Às Repúblicas Hakuna, Makuta e Sauna, lugares onde pude vivenciar e compartilhar muitos momentos de alegria junto de pessoas incríveis. Em especial aos meus amigos e únicos fãs Fernando, Gabriel A., Gabriela e Iago, mesmo distantes vocês estiveram presentes durante todo o projeto. Agradeço também a Rodolfo, Sofia, Gabriel M., Artemis, Paulo e Alana, a vida é mais feliz e leve com vocês por perto.

## RESUMO

Para locais onde ocorre a produção de medicamentos não estéreis, as farmacopeias mundiais recomendam que se faça a monitoração de partículas viáveis e não viáveis. Este procedimento não é capaz de garantir que o produto final esteja livre de contaminantes, porém nos fornece informações a respeito de possíveis riscos a que possam estar expostos. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo quantificar as partículas viáveis e caracterizar os microrganismos encontrados em áreas limpas de grau D de uma indústria farmacêutica, assim como identificar influências climáticas sazonais sobre estes ambientes. As amostragens ocorreram através de monitoração de ar ativa e de superfície em meios TSA e SWAB, respectivamente. As amostras foram incubadas, as unidades formadoras de colônias (UFC) quantificadas e, posteriormente identificadas utilizando testes bioquímicos no caso de bactérias e/ou leveduras e análises morfológicas para fungos filamentosos. Os dados foram organizados mensalmente e em períodos sazonais (seco e chuvoso), de acordo com a metodologia de amostragem, o local e o microrganismo encontrado. A dispersão dos dados foi expressa em diagramas de caixa e as comparações feitas através dos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na quantidade de UFCs de bactérias e fungos entre os meses e entre os períodos sazonais, em ambos os métodos de amostragem. Comparando as metodologias, a amostragem de ar demonstrou recuperar mais microrganismos em relação a amostragem de superfícies. Entre os microrganismos de maior incidência se destacaram as bactérias *Staphylococcus epidermidis* (15%) e *Micrococcus* spp. (13%), comuns na microbiota humana, e os fungos *Cladosporium* sp. (23%) e *Penicillium* sp. (21%), frequentemente encontrados em áreas limpas. Em conclusão, os níveis microbianos nas áreas de grau D estiveram dentro do estabelecido para os níveis máximos nessas áreas e mantiveram-se semelhantes ao longo do ano, não sendo influenciados de maneira relevante pelo tipo de amostragem ou pelo período sazonal. Com base nos resultados, fica evidente que o controle de qualidade microbiológico nas áreas limpas é eficiente e sua manutenção se faz necessária para manter um nível de biocarga controlado.

**PALAVRAS-CHAVE:** medicamentos não estéreis, monitoração ambiental, microbiota, áreas limpas.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS GERAIS .....	8
2.1. Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
3.1. Metodologias de amostragem de ar e superfícies.....	8
3.2. Quantificação e identificação microbiana .....	9
3.3. Organização dos dados coletados .....	10
3.4. Análise estatística.....	11
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO .....	23
7. REFERÊNCIAS .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica é responsável por transformar intermediários químicos, extratos vegetais e microrganismos em princípios ativos que são empregados na produção de medicamentos utilizados para o tratamento e prevenção de doenças. Mundialmente o setor é composto por mais de 10 mil empresas e tem se destacado como um dos mais inovadores entre os setores produtivos, com empresas multinacionais de grande porte capazes de estimular e incorporar aos seus produtos os principais avanços tecnológicos e científicos nas áreas de ciências biomédicas, biológicas e químicas (CAPANEMA, 2006).

Os produtos farmacêuticos são controlados de acordo com parâmetros de qualidade físico-químicos e microbiológicos, que os classificam em produtos estéreis ou não estéreis. Os níveis máximos de carga microbiana permitida ou a total ausência destes está diretamente relacionada à via de administração desses produtos. A aplicação dos estéreis pode acontecer por via parenteral ou então de maneira tópica em tecidos sensíveis. Desta forma, estes produtos possuem um alto risco de contaminar o paciente caso deixem de ser estéreis, visto que patógenos indesejados podem estar entre os contaminantes e, com o objetivo de minimizar ao máximo este risco, todo o seu processo produtivo necessita estar submetido a métodos que possam garantir a eliminação de qualquer biocarga presente no produto final (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019). No caso dos produtos não estéreis, sua administração ocorre em locais onde existem defesas físicas e imunológicas do corpo atuando na prevenção de uma possível infecção, como por exemplo a pele e a cavidade oral. Por este motivo, é permitido que estes produtos apresentem um nível controlado de biocarga que varia de acordo com a origem do fármaco e sua via de administração, expresso em unidade formadora de colônia (UFC). Pesquisas por patógenos também devem ser feitas com base na via de administração do produto (ANVISA, 2019).

Independente do ramo de atuação e da forma de administração dos fármacos, a essência da lógica industrial preza tanto pela qualidade de seus produtos como também pela redução do custo de produção (STAL & CAMPANÁRIO, 2010). Diversos órgãos são responsáveis por fiscalizar a qualidade dos medicamentos e produtos através de exigências que variam de acordo com o país em que estão situados. O *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, o *European Medicines*

Agency (EMA) na União Europeia, *Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan* (MHLW) no Japão, a *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios* (COFEPRIS) no México e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, são exemplos de agências reguladoras (BRITO & FLEXA, 2019).

A garantia do cumprimento das exigências de qualidade é realizada através de resoluções desenvolvidas pelas próprias instituições, como por exemplo as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) e as Instruções Normativas (IN) emitidas pela ANVISA ou o estabelecimento de normas padrões de reconhecimento mundial, como a Organização Internacional de Normatização (ISO). Além disso, muitos países utilizam compêndios contendo monografias de medicamentos, métodos de análises validados e recomendações importantes para qualidade dos produtos e insumos farmacêuticos, denominados farmacopeias (BRITO & FLEXA, 2019).

A cadeia produtiva de um medicamento é composta por diferentes áreas controladas que possuem um sistema de Aquecimento, Ventilação e Ar-Condicionado (AVAC) controlado, restrições no acesso de pessoas, procedimentos de sanitização específicos e exigem o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), conhecidas como áreas limpas (SANDLE, 2006; GEBALA & SANDLE, 2013). Utilizando como referência os parâmetros internacionais da ISO (2015), a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelece diferentes classificações para estas áreas de acordo com o grau de exposição do produto ao ambiente e o tamanho das partículas suspensas no ar (Tabela 1), havendo uma quantidade específica para cada grau de classificação (ABNT NBR ISO 14644-1, 2019).

**Tabela 1.** Concentrações máximas permitidas (partículas/m<sup>3</sup>) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados

Classificação da ISO (Classes)	Tamanho das partículas					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1,0 µm	5,0 µm
1	10	-	-	-	-	-
2	100	24	10	-	-	-
3	1.000	237	102	35	-	-
4	10.000	2.370	1.020	352	83	-
5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	-
6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

Adaptado da ABNT NBR ISO 14644-1, 2019

Utilizando os parâmetros do guia de Boas Práticas de Fabricação emitido pela EMA, o Brasil através da IN nº 35 (2019) referente a RDC 301 (2019) estabelece outro critério de classificação similar a ISO e um pouco mais abrangente, especificando critérios a respeito do uso das áreas (“em repouso” e “em operação”) e dos limites de contaminação microbiológica permitidos (Tabela 2 e 3).

**Tabela 2.** Número máximo de partículas por m<sup>3</sup> iguais ou maiores que o tamanho tabulado

Grau	Em repouso		Em operação	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	não definido	não definido

Adaptado da Instrução Normativa nº 35, 2019

**Tabela 3.** Limites máximos de partículas viáveis recomendados para áreas limpas.

Grau	Amostra de ar (UFC/m <sup>3</sup> )	Placas de sedimentação (diâmetro de 90 mm) (UFC/4 horas)	Placas de contato (diâmetro de 55 mm) (UFC/placa)	Testagem em luvas (5 dedos) (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Adaptado da Instrução Normativa nº 35, 2019

Para garantir a efetividade dos métodos de controle de partículas viáveis nas áreas limpas e uma biocarga mínima nos produtos, deve ser realizado o monitoramento ambiental (GORDON et al., 2014; BRASIL, 2019a). Através dos dados obtidos, é possível identificar tendências de crescimento microbiano e examinar suas causas e origem, um dos fatores de impacto na proliferação de microrganismos em produtos (ASHOUR et al., 2011; GEBALA & SANDLE, 2013; MAHNERT et al., 2015). O monitoramento ambiental é uma importante ferramenta para identificar a microbiota local, contribuindo em tomadas de decisões como a busca de possíveis fontes de contaminação em casos de desvios de qualidade ou a escolha de sanitizantes para uso em uma determinada área (PINTO et al., 2015).

Além do controle de qualidade realizado durante o processo de fabricação, caso ocorra a detecção de alguma irregularidade que possa causar danos à saúde do

paciente após a liberação da comercialização de um medicamento, o fabricante é responsável por realizar o recolhimento de todos os lotes envolvidos, através do procedimento conhecido como *recall* (ALVES & KALLAS, 2017). Situações como esta resultam em prejuízos financeiros e danos à reputação das empresas, evidenciando a importância em assegurar a qualidade e o controle microbiológico durante todo o processo produtivo (NAGAICH & SADHNA, 2015). Segundo o FDA (2020), nos Estados Unidos foram recolhidos do mercado 211 tipos de medicamentos diferentes entre os anos de 2018 e 2019. Deste total, aproximadamente 13% ocorreram devido a contaminação microbiológica.

Deste modo, dada a importância do controle de qualidade e do monitoramento ambiental na produção de medicamentos, o presente estudo avaliou o perfil da microbiota nos ambientes produtivos de uma indústria farmacêutica, identificando tendências sazonais e determinando os principais contaminantes presentes nas áreas avaliadas.

## **2 OBJETIVOS GERAIS**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota e os níveis de contaminação em áreas produtivas de grau D (ISO 8) de uma indústria farmacêutica, verificando a possível influência da sazonalidade na contaminação microbiana.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Coletar e compilar os dados mensais registrados de monitoramento ambiental de salas de produção, durante o período de janeiro a dezembro de 2019;
- Avaliar tendências de crescimento microbiano através de amostragens do ar (UFC/m<sup>3</sup>) e de superfícies (UFC/25cm<sup>2</sup>) ao longo dos meses do ano e durante os períodos seco e chuvoso.
- Identificar os táxons de fungos e bactérias de maior incidência na microbiota das áreas produtivas.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Metodologias de amostragem de ar e superfícies**

Durante o período de janeiro a dezembro de 2019 foram realizadas mensalmente amostragens do ar e das superfícies das áreas onde produtos e

matérias-primas estiveram expostos ao ambiente. A fábrica em que as amostras foram obtidas fica localizada na região metropolitana de Campinas, interior de São Paulo. O local possui diferentes prédios onde há produção de medicamentos líquidos de via oral e de sólidos do tipo comprimido, salas de classificação ISO 8 ou grau D. Estes prédios estão divididos em salas que alocam os processos de dispensação, granulação, mistura, formulação, compressão, revestimento, envase, embalagem e amostragem de matéria-prima. Foram estabelecidos 34 pontos de amostragem de ar e 66 pontos de superfícies, distribuídos entre 33 salas localizadas em 5 prédios produtivos da empresa. Os monitoramentos foram realizados somente durante fluxo produtivo, ou seja, enquanto as salas estiveram em operação.

Para a realização da monitoração de superfície, amostras foram coletadas das superfícies utilizando placas de contato do tipo RODAC® (Laborclin, Brasil) contendo o meio SWAB, composto de TSA (Trypticase soy agar, Difco, EUA), lecitina de soja (Thermo Fisher Scientific, EUA) e Tween 80 (INLAB, Brasil). O teste consiste em posicionar delicadamente o meio de cultivo sobre a superfície plana desejada, girando a placa três vezes suavemente para garantir que todo o ágar contate o local amostrado. A monitoração de ar ocorreu através do método ativo, realizado em áreas produtivas onde o produto ou a matéria-prima apresentaram algum grau de exposição ao ambiente. Para este método utilizou-se o amostrador de ar para partículas viáveis AIR IDEAL® 3P® da empresa BioMérieux (Crapone, França), que amostra 1000 L de ar do ambiente desejado e o deposita em placa de Petri contendo o meio de cultivo TSA (Difco, EUA). Todas as placas obtidas em ambos os processos foram incubadas em temperatura de 20 a 25 °C por 3 a 5 dias e, após este período, foram retiradas e incubadas novamente em outra estufa na faixa de 30 a 35 °C por mais um período de 2 a 3 dias.

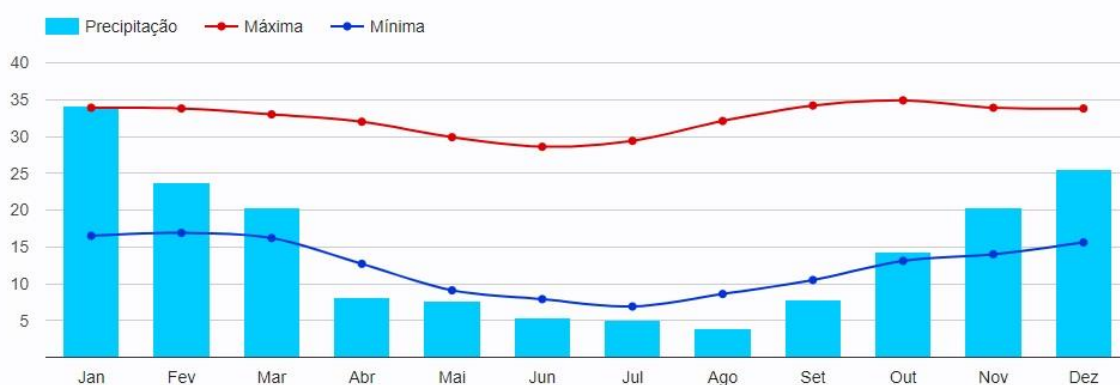
### **3.2 Quantificação e identificação microbiana**

Após o término do período de incubação, as placas de Petri foram analisadas e havendo crescimento microbiológico, a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) eram contabilizadas e registradas de acordo com a data da coleta, o tipo de amostragem, o tipo de microrganismo (bactéria ou fungo), o prédio e o ponto em que foram encontradas. Para as amostragens de ar, os registros foram feitos em UFC/m<sup>3</sup> enquanto que os dados de amostragem de superfície foram registrados como UFC/25cm<sup>2</sup>. Feita a contagem, as UFCs eram distinguidas morfologicamente antes

de serem submetidas ao processo de identificação. Nos casos em que bactérias ou leveduras apresentaram morfologia similar na mesma placa de Petri, apenas uma das colônias era selecionada para repique, coloração de Gram (Laborclin, Brasil) e posterior identificação através de kits bioquímicos (API®, BioMérieux, Crapone, França). A mesma metodologia para seleção de colônias se aplicou aos fungos, que eram encaminhados a uma empresa terceira que os identificava através de análises morfológicas. Os microrganismos foram identificados e ranqueados anual e mensalmente, de acordo com sua incidência.

### 3.3 Organização dos dados coletados

Os resultados obtidos através das amostragens e das identificações microbianas foram organizados e tratados através do software Excel® (2019). Para os dados de UFC obtidos das informações foram registrados: tipo de monitoração, prédio, ponto, mês e o número de colônias de bactérias e fungos contabilizados. Para compreender a influência das condições climáticas externas na microbiota encontrada nas áreas produtivas, os resultados das amostragens foram agrupados em diferentes períodos. O primeiro agrupamento foi de acordo com os meses de coleta, dando origem a doze grupos distintos (janeiro a dezembro). O segundo agrupou os dados de acordo com a temperatura e o volume histórico de chuvas (dados de precipitação pluvial) da região de Campinas (Figura 1), originando dois grupos denominados de período seco (abril a setembro) e período chuvoso (outubro a março). Para avaliar a dispersão dos dados foram utilizados diagramas de caixa.



**Figura 1. Média mensal da temperatura máxima (em graus Celsius °C), mínima (em graus Celsius °C) e da precipitação (em milímetros) em Campinas registrados pela estação meteorológica do CEPAGRI/UNICAMP, no período de 1990 a 2019. Fonte: CEPAGRI, 2020.**

As identificações foram registradas de acordo com o mês, o prédio, o ponto, o tipo de amostragem e o microrganismo identificado em cada amostra coletada. Para traçar um perfil geral da microbiota da fábrica, os microrganismos foram agrupados por tipo (bactérias e fungos) e os dez mais incidentes de cada grupo foram obtidos. Para analisar o padrão de incidência mensal em relação ao perfil geral da fábrica, os dados foram separados por mês e organizados da mesma maneira citada anteriormente. Desta forma, os cinco microrganismos mais incidentes a cada mês foram obtidos.

### **3.4 Análises estatísticas**

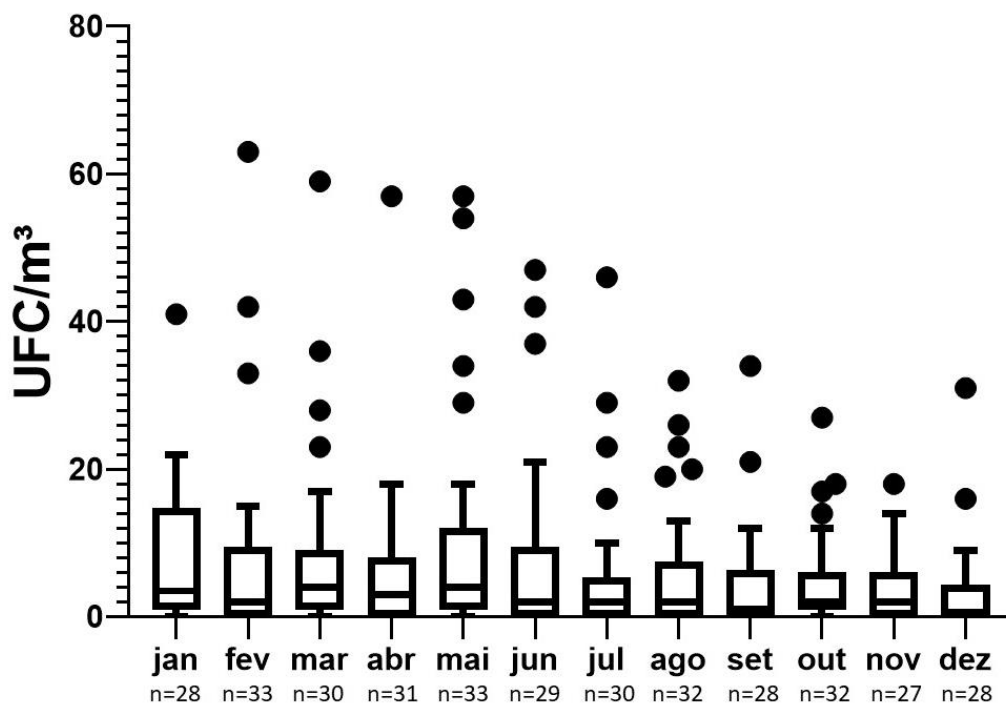
A comparação dos dados foi feita entre a variável dependente (número de UFCs) e as variáveis independentes (tipo de amostragem, período mensal e sazonal). Para compreensão a respeito da normalidade dos dados utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Com base nas distribuições observadas, foram utilizados os testes de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos e o de Kruskal-Wallis para comparações envolvendo três ou mais comparações. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Desta forma quando o valor de  $p>0,05$ , aceita-se a hipótese  $H_0$ , pelo qual pode-se dizer não existir diferenças estatísticas entre os grupos. Caso  $p<0,05$  se aceita a hipótese alternativa em que se pode dizer que as diferenças entre os grupos não são ao acaso e sim diferenças reais. Todos os cálculos foram realizados com o software GraphPad Prism versão 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

## **4 RESULTADOS**

O número de amostragens de ar e superfície variou durante o ano, sendo de 27 a 33 pontos de coleta mensais para as amostragens de ar e de 50 a 65 pontos para as amostragens de superfície. Essa variação no número ocorreu devido a não utilização dessas áreas, ou seja, áreas não utilizadas não foram amostradas para a quantificação de partículas viáveis e/ou identificação microbiana.

Segundo o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), todos os meses apresentaram distribuição não paramétrica em ambos os métodos de amostragem. Em função disso, o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos foi realizado para identificar diferenças no número de UFCs encontrados. Quanto às amostragens de ar e a comparação mensal ao longo de 12 meses dos dados de UFC/m<sup>3</sup> totais (bactérias e fungos) (Figura 2), os valores de mediana mensais oscilaram entre 0,5 e 4, sendo

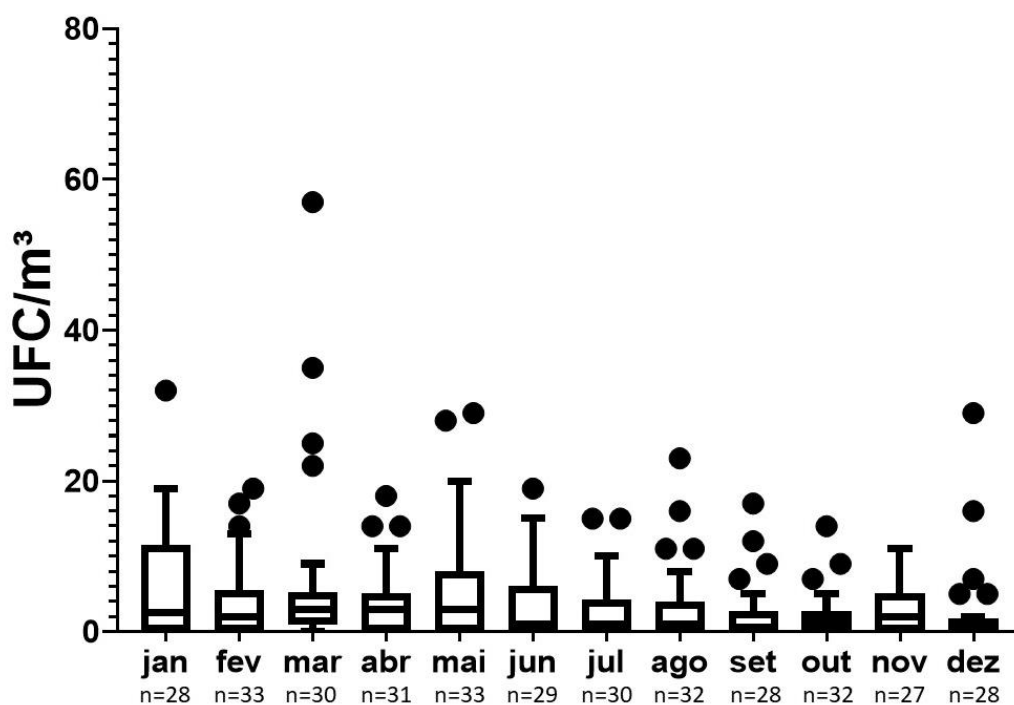
o menor valor encontrado referente ao mês de dezembro e o maior valor referente aos meses de março e maio. Houve pequena variação entre as medianas, porém com alguns pontos discrepantes, que de forma geral configuraram em uma não diferença estatística entre os meses amostrados ( $p = 0,1596$ ; Kruskal-Wallis).



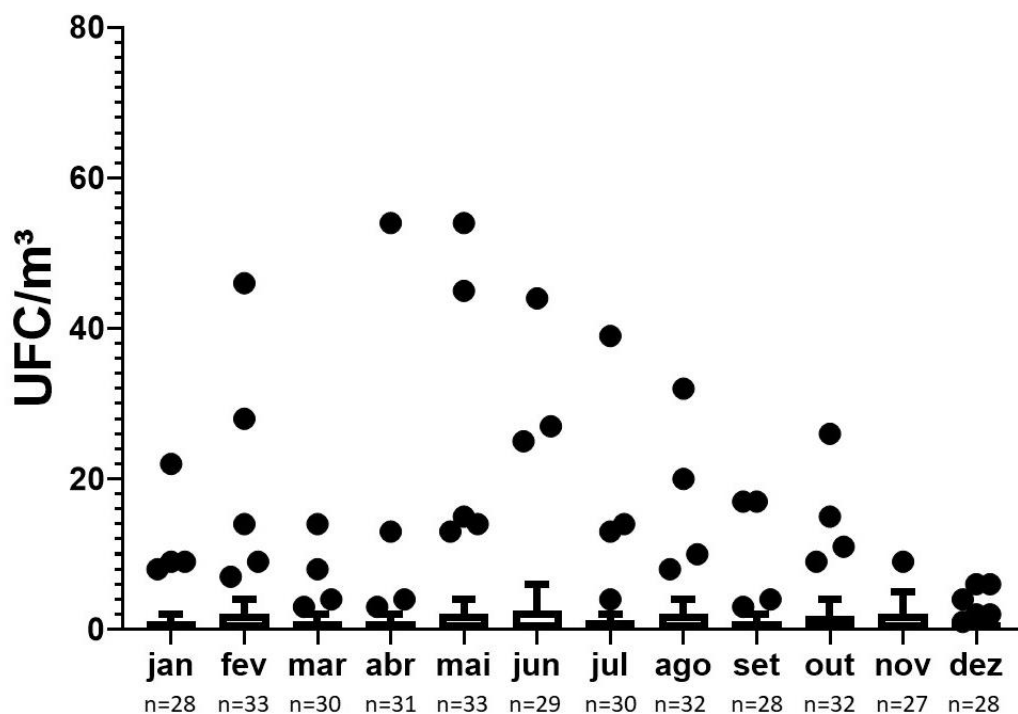
**Figura 2. Dispersão da contagem total de microrganismos amostrados no ar ( $UFC/m^3$ ) dos ambientes fabris ao longo do ano.** Diagrama de caixa representando a mediana, o 1<sup>o</sup> e o 3<sup>o</sup> quartil, os limites superior e inferior, e os *outliers*. O valor de n representa o número de amostragens realizadas no mês. A comparação dos dados foi feita por teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

Ao analisar os grupos de microrganismos individualmente, foi possível observar que, na quantificação total de bactérias (Figura 3A), as medianas oscilaram entre 0 e 3, com o menor valor no mês de dezembro e o maior valor nos meses de março, abril e maio. Não foram detectadas diferenças significativas durante o período analisado ( $p = 0,0506$ ; Kruskal-Wallis). Já no que diz respeito a contagem de fungos (Figura 3B), a mediana de todos os meses foi igual a 0. Não foram detectadas diferenças significativas durante o período analisado ( $p = 0,8318$ ; Kruskal-Wallis).

## A) Bactérias



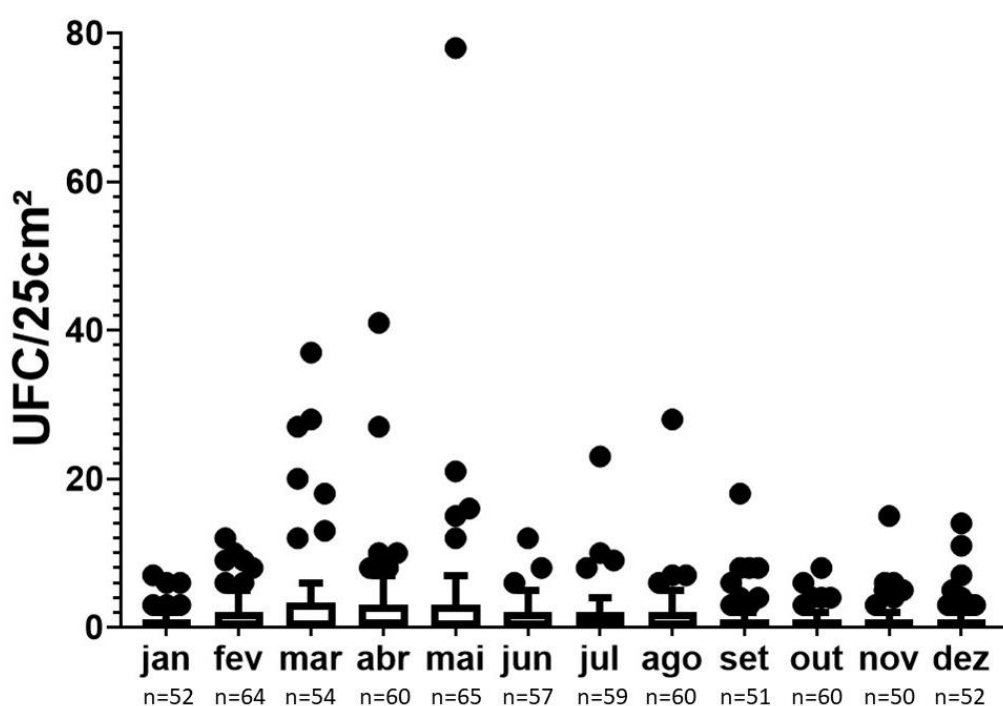
## B) Fungos



**Figura 3. Dispersão dos grupos de bactérias (A) e fungos (B) amostrados no ar (UFC/m<sup>3</sup>) dos ambientes fabris ao longo do ano.** Diagrama de caixa representando a mediana, os 1<sup>o</sup> e o 3<sup>o</sup> quartis, os limites superior e inferior, e os *outliers*. O valor de n representa o número de amostragens realizadas no mês. A comparação dos dados foi feita por teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

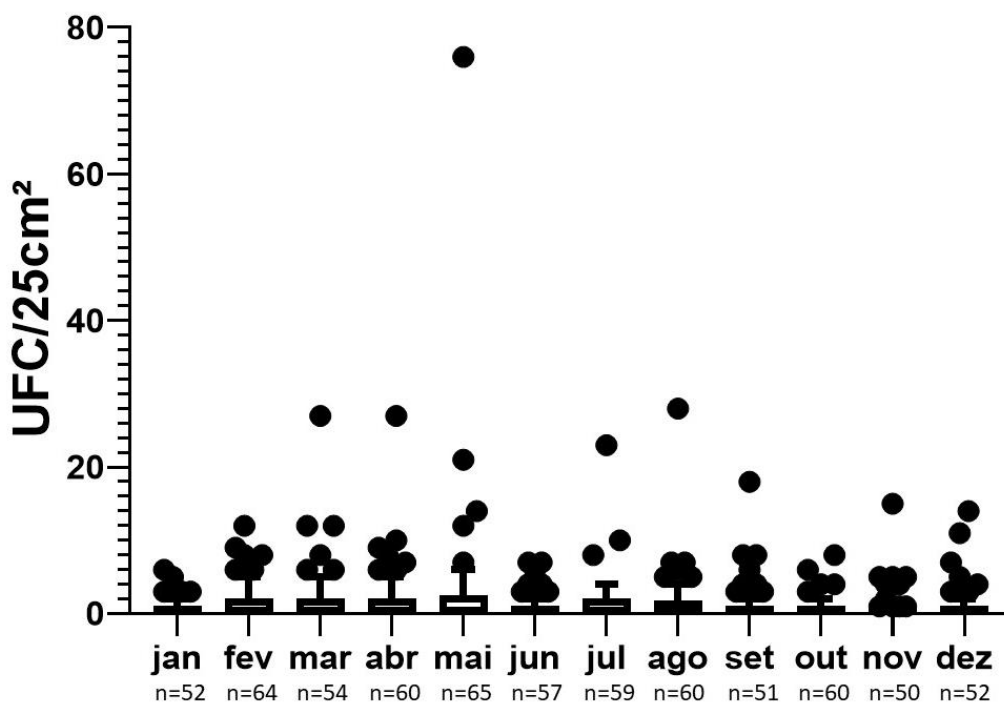
A dispersão das UFC/25cm<sup>2</sup> totais obtidas através da monitoração de superfície (Figura 4) apresentou mediana no valor de 1 para o mês de julho e 0 para

os outros onze meses. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas ( $p = 0,1396$ ; Kruskal-Wallis). Individualmente, tanto as bactérias quanto os fungos apresentaram mediana igual a 0 (Figura 5). Para a quantificação total dos fungos, vale ressaltar que o 3º quartil de todos os meses foi igual a zero, ou seja, em 75% das amostragens de superfície a presença deste grupo de microrganismos não foi detectada. Não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo das bactérias ( $p = 0,1521$ ; Kruskal-Wallis) e dos fungos ( $p = 0,02835$ ; Kruskal-Wallis) durante o período analisado.

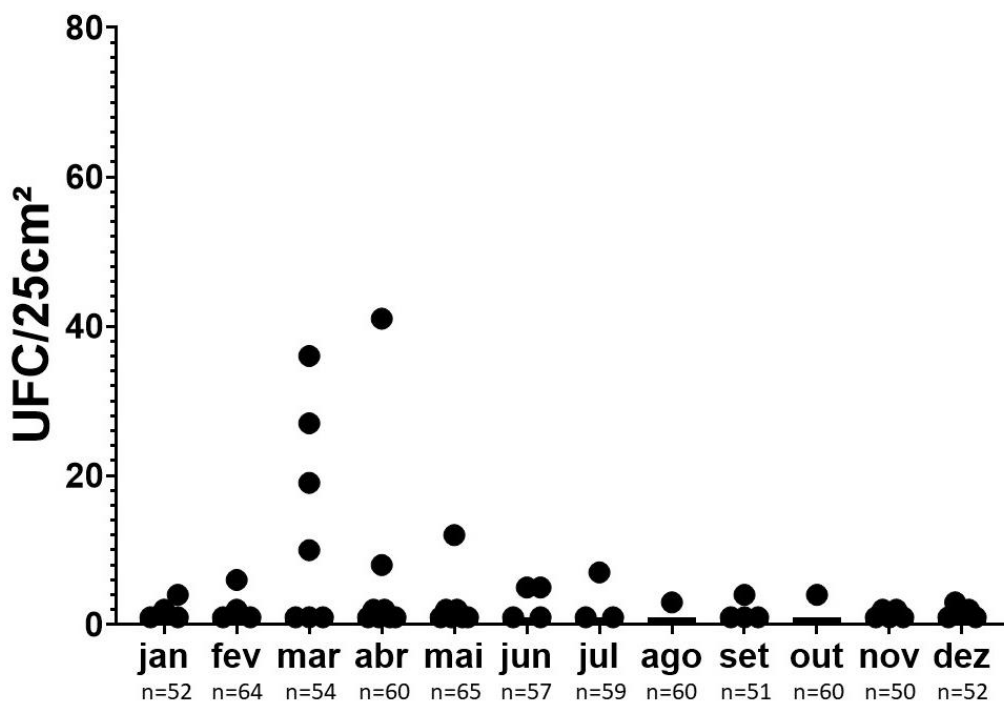


**Figura 4. Dispersão da contagem total de microrganismos amostrados nas superfícies (UFC/25cm<sup>2</sup>) dos ambientes fabris ao longo do ano.** Diagrama de caixa representando a mediana, os 25º e 75º quartis, os limites superior e inferior, e os *outliers*. O valor de n representa o número de amostragens realizadas no mês. A comparação dos dados foi feita por teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

## A) Bactérias

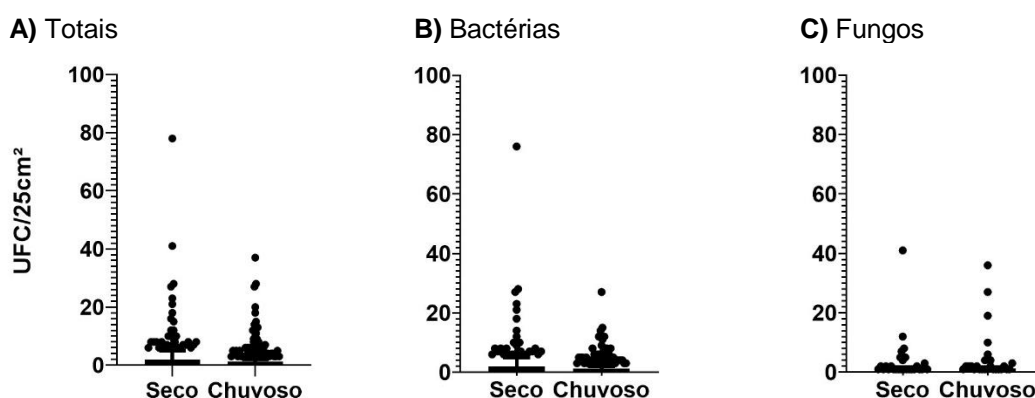


## B) Fungos

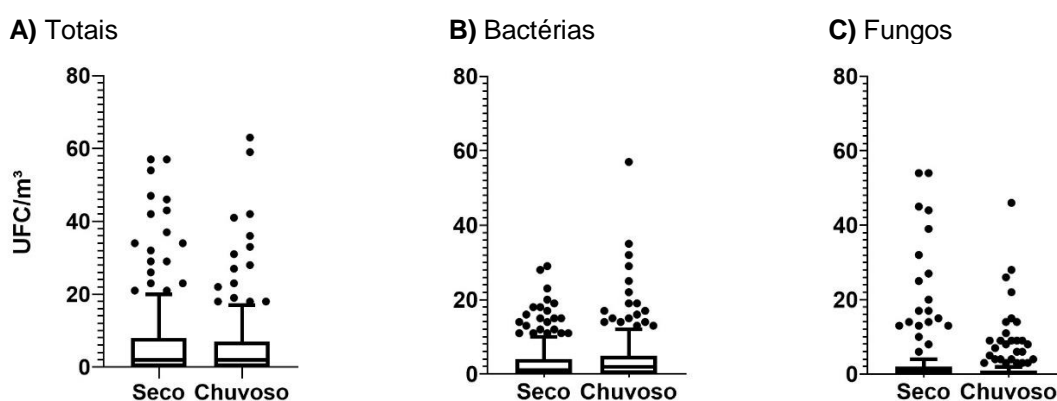


**Figura 5. Dispersão dos grupos de bactérias (A) e fungos (B) amostrados nas superfícies (UFC/25cm<sup>2</sup>) dos ambientes fabris ao longo do ano.** Diagrama de caixa representando a mediana, os 1º e o 3º quartis, os limites superior e inferior, e os *outliers*. O valor de n representa o número de amostragens realizadas no mês. A comparação dos dados foi feita por teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

Para a avaliação sazonal, os dados de amostragem de ar e superfície foram agrupados de acordo com o período de chuva e o período seco (seco – meses de abril, maio, junho, julho, agosto e setembro – e chuvoso – meses de outubro, novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março). Foram realizadas 352 amostragens durante o período seco e 332 durante o período chuvoso no método de superfície (Figura 6). Já no que diz respeito a monitoração de ar (Figura 7), foram realizadas 183 amostragens durante o período seco e 178 durante o período chuvoso.



**Figura 6:** Dispersão da contagem total de microrganismos amostrados nas superfícies (UFC/25cm<sup>2</sup>) dos ambientes fabris ao longo dos períodos seco (abril, maio, junho, julho, agosto e setembro) e chuvoso (janeiro, fevereiro, março, outubro, novembro e dezembro). Totalizaram-se 352 amostragens para o período seco e 332 para o chuvoso. A comparação dos dados foi feita por teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ). A mediana dos três grupos em ambos os períodos foi igual a 0.

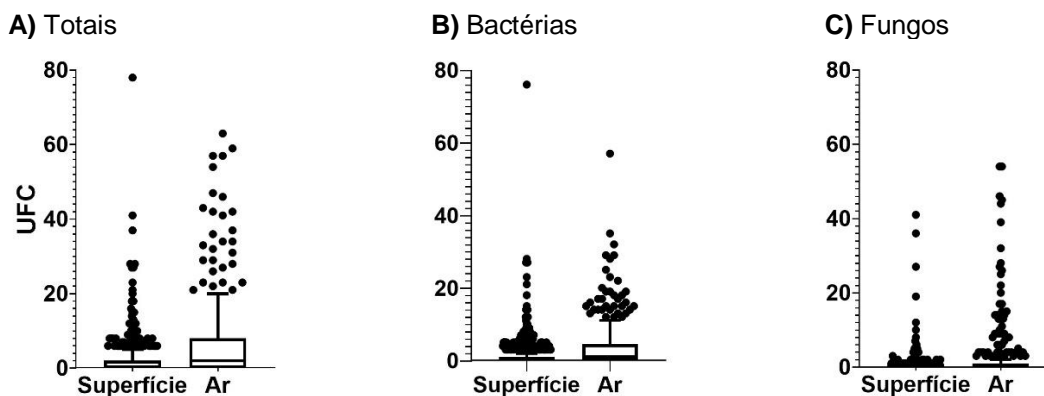


**Figura 7:** Dispersão da contagem de microrganismos amostrados no ar (UFC/m<sup>3</sup>) ao longo dos períodos seco (abril, maio, junho, julho, agosto e setembro) e chuvoso (janeiro, fevereiro, março, outubro, novembro e dezembro). Totalizaram-se 183 amostragens para o período seco e 178 para o chuvoso. A comparação dos dados foi feita por teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ). **A)** Mediana igual a 2 em ambos os períodos. **B)** Mediana igual a 1 durante o período seco e 2 no período chuvoso. **C)** Mediana igual a 0 em ambos os períodos.

Quando analisados os dados de amostragem de ar, verificou-se que as medianas do período seco não diferiram do período chuvoso em nenhum dos três

grupos analisados, UFCs totais ( $p < 0,0890$ ), bactérias ( $p < 0,0836$ ) e fungos ( $p < 0,9195$ ) (Mann Whitney). O mesmo perfil foi encontrado para as amostras de superfície, onde as comparações não diferiram entre os períodos sazonais das UFCs totais ( $p < 0,8505$ ), das bactérias ( $p < 0,6170$ ) e dos fungos ( $p < 0,5854$ ) (Mann Whitney).

Ao longo do ano houve um total 684 amostras de superfícies e 361 amostras de ar. Em comparação entre as medianas dos tipos de amostragem (ar e superfície) foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre elas para os três grupos analisados, UFCs totais ( $p < 0,0001$ ), bactérias ( $p < 0,0001$ ) e fungos ( $p < 0,0001$ ) (Mann-Whitney). Constatamos em sequência, que nas UFCs totais (Figura 8A) a mediana e a amplitude interquartil (IQR) das amostragens de ar (mediana = 2 e IQR = 8) foram superiores às de superfície (mediana = 0 e IQR = 2). No grupo das bactérias (Figura 8B) é possível observar o mesmo, ambos os parâmetros com valores superiores nas amostragens de ar (mediana = 1 e IQR = 4,5) em relação às de superfície (mediana = 0 e IQR = 1). Nos fungos (Figura 8C), as amostragens de ar (mediana = 0 e IQR = 1) obtiveram resultados similares às de superfície (mediana = 0 e IQR = 0), havendo diferença apenas no valor de IQR.



**Figura 8:** Dispersão da contagem de microrganismos amostrados nas superfícies (UFC/25cm<sup>2</sup>) e no ar (UFC/m<sup>3</sup>) dos ambientes fabris ao longo do ano. 684 amostragens de superfícies e 361 amostragens de ar. A comparação dos dados foi feita por teste de Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ).

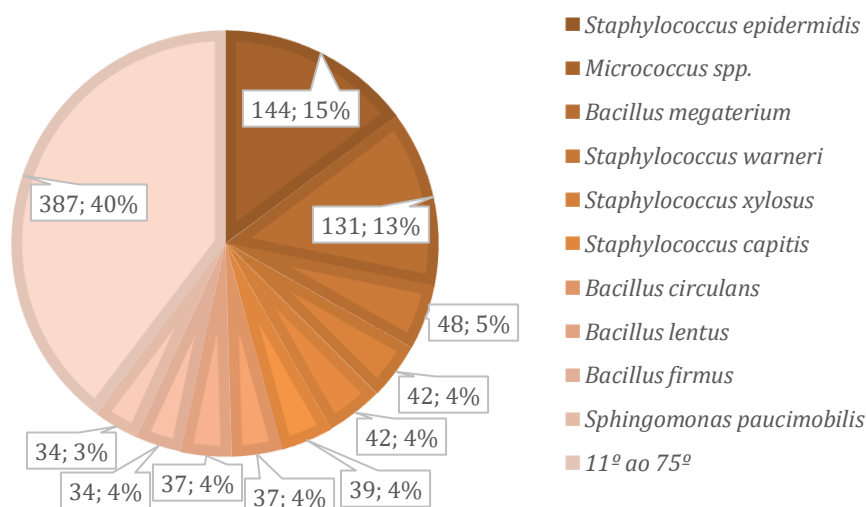
Durante todo o período analisado foram contabilizadas através de ambos os métodos de amostragem um total de 3558 UFCs, somando tanto bactérias quanto fungos. Deste total, 1339 microrganismos foram identificados, nos fornecendo informações a respeito de aproximadamente 37,6% da microbiota destes ambientes (Tabela 4). Do total de identificações microbianas, 975 foram referentes a bactérias e 364 a fungos. Com base nestes dados, os microrganismos mais incidentes na fábrica

foram ranqueados por grupo (Figura 9 e 10). Entre as bactérias mais comuns estão *Staphylococcus epidermidis* (174; 15%), *Micrococcus* spp. (131; 13%) e *Bacillus megaterium* (48; 5%). No grupo dos fungos os mais recorrentes foram *Cladosporium* sp. (85, 23%), *Penicillium* sp. (76, 21%) e *Curvalaria* sp. (52; 14%). A incidência de microrganismos também foi observada ao longo dos meses para ambos os grupos de microrganismos (Tabelas 5 e 6).

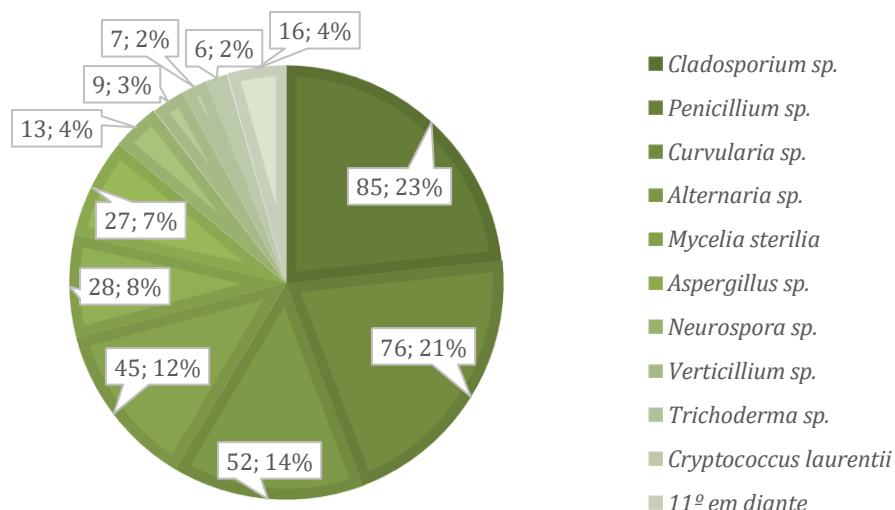
**Tabela 4.** Porcentagem de identificações em relação ao total de UFCs contabilizadas.

	Total			Bactérias			Fungos		
	UFCs	IDs	%	UFCs	IDs	%	UFCs	IDs	%
JANEIRO	265	100	37,7%	202	79	39,1%	63	21	33,3%
FEVEREIRO	351	106	30,2%	223	74	33,2%	128	32	25,0%
MARÇO	453	132	29,1%	321	88	27,4%	132	44	33,3%
ABRIL	373	105	28,2%	235	96	40,9%	138	9	6,5%
MAIO	562	138	24,6%	385	115	29,9%	177	23	13,0%
JUNHO	292	126	43,2%	159	82	51,6%	133	44	33,1%
JULHO	279	111	39,8%	189	76	40,2%	90	35	38,9%
AGOSTO	282	130	46,1%	192	97	50,5%	90	33	36,7%
SETEMBRO	188	112	59,6%	133	75	56,4%	55	37	67,3%
OUTUBRO	200	126	63,0%	118	85	72,0%	82	41	50,0%
NOVEMBRO	156	88	56,4%	118	63	53,4%	38	25	65,8%
DEZEMBRO	157	65	41,4%	127	45	35,4%	30	20	66,7%
<b>TOTAL</b>	<b>3558</b>	<b>1339</b>	<b>37,6%</b>	<b>2402</b>	<b>975</b>	<b>40,6%</b>	<b>1156</b>	<b>364</b>	<b>31,5%</b>

**IDs:** número de identificações. **%:** porcentagem de identificações em relação ao número de UFCs contabilizados no período.



**Figura 9: Bactérias de maior incidência ao longo do ano.** Foram identificadas no total 75 microrganismos diferentes.



**Figura 10: Fungos de maior incidência ao longo do ano.** Foram identificadas no total 19 gêneros de microrganismos diferentes.

**Tabela 5: Bactérias de maior incidência ao longo dos meses.**

Mês	Microrganismo	IDs	%	Mês	Microrganismo	IDs	%
Janeiro	<i>Micrococcus</i> spp.	13	16,5%	Julho	<i>Micrococcus</i> spp.	16	21,1%
	<i>Staphylococcus hominis</i>	7	8,9%		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	15,8%
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	8,9%		<i>Staphylococcus warneri</i>	6	7,9%
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	8,9%		<i>Bacillus firmus</i>	4	5,3%
	<i>Staphylococcus capitis</i>	5	6,3%		<i>Bacillus megaterium</i>	4	5,3%
	6º em diante	40	50,6%		6º em diante	34	44,7%
Fevereiro	<i>Staphylococcus simulans</i>	12	16,2%	Agosto	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21	21,6%
	<i>Bacillus pumilus</i>	10	13,5%		<i>Bacillus firmus</i>	11	11,3%
	<i>Micrococcus lylae</i>	9	12,2%		<i>Micrococcus</i> spp.	9	9,3%
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	8,1%		<i>Staphylococcus warneri</i>	8	8,2%
	<i>Staphylococcus warneri</i>	4	5,4%		<i>Staphylococcus xylosus</i>	6	6,2%
	6º em diante	33	44,6%		6º em diante	42	43,3%
Março	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	14,8%	Setembro	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	17,3%
	<i>Micrococcus lylae</i>	11	12,5%		<i>Micrococcus</i> spp.	13	17,3%
	<i>Staphylococcus simulans</i>	6	6,8%		<i>Bacillus circulans</i>	8	10,7%
	<i>Bacillus megaterium</i>	5	5,7%		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	5	6,7%
	<i>Bacillus sphaericus</i>	4	4,5%		<i>Bacillus lentus</i>	5	6,7%
	6º em diante	49	55,7%		6º em diante	31	41,3%
Abril	<i>Micrococcus</i> spp.	20	20,8%	Outubro	<i>Micrococcus</i> spp.	14	16,5%
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12	12,5%		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	15,3%
	<i>Staphylococcus capitis</i>	4	4,2%		<i>Staphylococcus xylosus</i>	8	9,4%
	<i>Bacillus megaterium</i>	4	4,2%		<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	6	7,1%
	<i>Staphylococcus cohnii spp cohnii</i>	4	4,2%		<i>Staphylococcus hominis</i>	5	5,9%
	6º em diante	52	54,2%		6º em diante	39	45,9%
Maio	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18	15,7%	Novembro	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	17,5%
	<i>Micrococcus</i> spp.	16	13,9%		<i>Micrococcus</i> spp.	10	15,9%
	<i>Bacillus circulans</i>	10	8,7%		<i>Bacillus megaterium</i>	6	9,5%
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	10	8,7%		<i>Staphylococcus hominis</i>	5	7,9%
	<i>Bacillus lentus</i>	9	7,8%		<i>Bacillus circulans</i>	5	7,9%
	6º em diante	52	45,2%		6º em diante	26	41,3%
Junho	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	15,9%	Dezembro	<i>Micrococcus</i> spp.	11	24,4%
	<i>Bacillus megaterium</i>	11	13,4%		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	11,1%
	<i>Staphylococcus warneri</i>	5	6,1%		<i>Bacillus lentus</i>	5	11,1%
	<i>Micrococcus</i> spp.	4	4,9%		<i>Staphylococcus capitis</i>	4	8,9%
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	4	4,9%		<i>Bacillus firmus</i>	3	6,7%
	6º em diante	45	54,9%		6º em diante	17	37,8%

**Tabela 6:** Fungos de maior incidência ao longo dos meses.

Mês	Microrganismo	IDs	%	Mês	Microrganismo	IDs	%
Janeiro	<i>Cladosporium</i> sp.	7	33,3%	Julho	<i>Cladosporium</i> sp.	7	20,0%
	<i>Penicillium</i> sp.	5	23,8%		<i>Alternaria</i> sp.	6	17,1%
	<i>Aspergillus</i> sp.	3	14,3%		<i>Penicillium</i> sp.	5	14,3%
	<i>Alternaria</i> sp.	2	9,5%		<i>Curvularia</i> sp.	5	14,3%
	<i>Neurospora</i> sp.	1	4,8%		<i>Mycelia sterilia</i>	3	8,6%
	6º em diante	3	14,3%		6º em diante	9	25,7%
Fevereiro	<i>Alternaria</i> sp.	7	21,9%	Agosto	<i>Penicillium</i> sp.	9	27,3%
	<i>Neurospora</i> sp.	5	15,6%		<i>Curvularia</i> sp.	7	21,2%
	<i>Curvularia</i> sp.	5	15,6%		<i>Cladosporium</i> sp.	6	18,2%
	<i>Mycelia sterilia</i>	5	15,6%		<i>Alternaria</i> sp.	3	9,1%
	<i>Penicillium</i> sp.	4	12,5%		<i>Mycelia sterilia</i>	2	6,1%
	6º em diante	6	18,8%		6º em diante	6	18,2%
Março	<i>Cladosporium</i> sp.	14	31,8%	Setembro	<i>Curvularia</i> sp.	7	18,9%
	<i>Penicillium</i> sp.	8	18,2%		<i>Cladosporium</i> sp.	7	18,9%
	<i>Mycelia sterilia</i>	6	13,6%		<i>Penicillium</i> sp.	5	13,5%
	<i>Aspergillus</i> sp.	4	9,1%		<i>Aspergillus</i> sp.	5	13,5%
	<i>Alternaria</i> sp.	4	9,1%		<i>Mycelia sterilia</i>	5	13,5%
	6º em diante	8	18,2%		6º em diante	8	21,6%
Abril	<i>Aspergillus</i> sp.	2	22,2%	Outubro	<i>Penicillium</i> sp.	15	36,6%
	<i>Verticillium</i> sp.	2	22,2%		<i>Cladosporium</i> sp.	8	19,5%
	<i>Alternaria</i> sp.	2	22,2%		<i>Curvularia</i> sp.	8	19,5%
	<i>Penicillium</i> sp.	1	11,1%		<i>Alternaria</i> sp.	6	14,6%
	<i>Curvularia</i> sp.	1	11,1%		<i>Aspergillus</i> sp.	2	4,9%
	6º em diante	1	11,1%		6º em diante	2	4,9%
Maio	<i>Cladosporium</i> sp.	10	43,5%	Novembro	<i>Penicillium</i> sp.	9	36,0%
	<i>Penicillium</i> sp.	4	17,4%		<i>Cladosporium</i> sp.	6	24,0%
	<i>Aspergillus</i> sp.	2	8,7%		<i>Alternaria</i> sp.	5	20,0%
	<i>Verticillium</i> sp.	2	8,7%		<i>Trichoderma</i> sp.	2	8,0%
	<i>Alternaria</i> sp.	1	4,3%		<i>Aspergillus</i> sp.	1	4,0%
	6º em diante	4	17,4%		6º em diante	2	8,0%
Junho	<i>Penicillium</i> sp.	10	22,7%	Dezembro	<i>Cladosporium</i> sp.	7	35,0%
	<i>Cladosporium</i> sp.	10	22,7%		<i>Alternaria</i> sp.	4	20,0%
	<i>Curvularia</i> sp.	9	20,5%		<i>Curvularia</i> sp.	4	20,0%
	<i>Mycelia sterilia</i>	5	11,4%		<i>Trichoderma</i> sp.	2	10,0%
	<i>Aspergillus</i> sp.	3	6,8%		<i>Verticillium</i> sp.	1	5,0%
	6º em diante	7	15,9%		6º em diante	2	10,0%

## 5 DISCUSSÃO

A distribuição das UFCs de bactérias e fungos evidenciam a baixa e constante biocarga presente nos ambientes produtivos, em ambos os métodos de amostragem. As medianas abaixo de 5 UFC para as amostragens de ar (m<sup>3</sup>) e superfície (25cm<sup>2</sup>), atendem as exigências da ANVISA em relação aos limites máximos de partículas viáveis recomendados para áreas limpas, conforme Tabela 3.

Em comparações entre os meses do ano e entre os períodos seco e chuvoso, os quais apresentaram uma distribuição de microrganismos similar entre si, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas, evidenciando não haver influência sazonal no que diz respeito a microbiota dos ambientes produtivos. Divergindo do presente estudo, em análises feitas por Utescher (2007), áreas limpas de grau D

envolvidas na produção de vacinas apresentaram tendências sazonais, havendo maior incidência de microrganismos durante o período chuvoso. Em escritórios e ambientes residenciais, Pastuszka (2000) e Bonetta (2010) também observaram aumento no número de UFCs de fungos e bactérias em meses chuvosos. A não detecção de influências sazonais sobre a microbiota da indústria analisada, pode estar relacionada ao controle biológico rigoroso realizado nas áreas limpas através de sistema AVAC, procedimentos de sanitização, restrição ao acesso de pessoas, utilização correta de EPIs e treinamento de pessoal, com o intuito de reduzir a contaminação do local.

A amostragem de ar apresenta diferenças estatísticas significativas em relação à amostragem de superfície, indicando que o método é capaz de detectar um maior número de UFCs por amostra. Um dos fatores que exerce influência sobre este resultado é o processo dinâmico (em uso) em que as salas estão durante as amostragens. A presença dos operadores e dos equipamentos pode deslocar o ar e carrear partículas até o amostrador de ar que, diferente das superfícies amostradas através de placas de contato, não depende que as partículas se assentem para que então possam ser capturadas. Gebala e Sandle (2011) obtiveram resultados similares em estudo onde observaram uma maior taxa de recuperação de fungos filamentosos nas amostragens de ar quando comparadas às de superfície.

Com base no perfil traçado da microbiota local, as bactérias de maior incidência foram os cocos gram-positivos *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus* spp., representando juntos 28% das identificações do grupo. Os resultados são similares aos encontrados por Cundell (2006), Utescher (2007) e Sandle (2011) em áreas limpas de grau C e D, em que ambos os gêneros de bactérias foram prevalentes. Estudos realizados em ambientes hospitalares e escritórios administrativos (BONETTA, 2010; PASTUSZKA, 2000; ASIF, 2018), áreas não classificadas que possuem sistema AVAC, também identificaram ambos os gêneros de bactérias entre os mais incidentes, constatando que a principal fonte de contaminação ambientes controlados é de origem humana.

Entre os fungos, mais frequentes, destacaram-se *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., somando 44% das identificações do grupo. Resultados similares aos obtidos eram esperados, uma vez que ambos os gêneros estão entre os fungos predominantemente encontrados em ambientes produtivos farmacêuticos (VIJAYAKUMAR et al., 2012; SANDLE, 2011). Mesmo se tratando de ambientes

controlados, fica evidente que há influência do meio externo na microbiota das áreas limpas, possivelmente através do carreamento de partículas por intermédio dos operários, materiais e/ou equipamentos de produção. O uso correto dos EPIs e um procedimento de sanitização adequado são as melhores alternativas para mitigar o problema (MISTRY et al., 2020).

O quinto fungo de maior incidência na fábrica e recorrente ao longo dos meses é o *Mycelia sterilia*, nomenclatura utilizada quando o micélio não desenvolve órgãos sexuais. Para a metodologia de identificação de fungos baseada em características morfológicas essas estruturas são essências para a classificação, o que demonstra ser uma grande limitação do método. Uma forma de reduzir a incidência deste tipo de resultado seria a utilização de meios de cultivo específicos durante as amostragens, visto que são capazes de fornecer melhores condições para o crescimento e a diferenciação dos órgãos sexuais do fungo. Alternativas mais custosas, mas que independem dos órgãos sexuais diferenciados, capazes de identificar os fungos no nível de espécie e também menos suscetíveis a erros em relação aos testes bioquímicos, são as metodologias baseadas em biologia molecular, que utilizam o material genético do microrganismo para sua classificação (SIBLEY et al., 2012). Os testes bioquímicos e as identificações morfológicas atendem as exigências das agências reguladoras assim como as técnicas baseadas em biologia molecular, o que torna o custo e o grau de especificidade os principais fatores a serem ponderados em uma escolha entre os métodos.

De modo geral, as áreas limpas de grau D utilizadas para a produção de medicamentos não estéreis apresentam um perfil constante e muito abaixo das especificações em relação às UFCs de bactérias e fungos, que não sofre influências climáticas sazonais. Com isso, fica evidente a importância do controle de partículas exercido sobre essas áreas através do sistema AVAC, dos procedimentos de sanitização, dos controles de acesso e do uso correto dos EPIs. Apesar da amostragem de ar possuir uma maior taxa de recuperação de microrganismos em relação a amostragem de superfície, a utilização de ambas as metodologias é importante para assegurar a eficiência no controle da biocarga depositada sobre as superfícies e suspensa no ar. A microbiota identificada segue um perfil similar entre os meses, em que a maioria dos microrganismos são originários do ambiente externo e da pele humana. A fim de reduzir os riscos de contaminação, as indústrias farmacêuticas devem realizar manutenções preventivas no sistema AVAC dos

ambientes produtivos classificados e manter o pessoal treinado e capacitado a respeito da importância das medidas de prevenção de contaminação microbiológica.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os níveis microbianos nas áreas de grau D da indústria farmacêutica analisada estiveram dentro do estabelecido para os níveis máximos nessas áreas e mantiveram-se semelhantes ao longo do ano, não sendo influenciados de maneira relevante pelo tipo de amostragem ou pelo período sazonal. Ainda, os microrganismos de maior prevalência foram do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* para bactérias e *Cladosporium* e *Penicillium*, para os fungos.

Esses dados demonstram que medidas preventivas de contaminação, controle microbiológico e monitoramento ambiental adequados, contribuem para assegurar a qualidade dos ambientes produtivos industriais.

## 7 REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 14644-1: **Salas limpas e ambientes controlados associados - Parte 1: Classificação da limpeza do ar por concentração de partículas**, Rio de Janeiro. 2º Ed., 2019.

ALVES, Adirley Machado; KALLAS FILHO, Elias. Recall de medicamentos. **Revista de Direito Sanitário**, v. 18, n. 2, p. 157-174, 2017.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

ASHOUR, Mohammed Seif El-Din; MANSY, Moselhy Salah; EISSA, Mostafa Essam. Microbiological environmental monitoring in pharmaceutical facility. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 63-74, 2011.

ASIF, Ayesha et al. Microbial quality assessment of indoor air in a large hospital building during winter and spring seasons. **Building and environment**, v. 135, p. 68-73, 2018.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, 2019a.

BRASIL. Instrução Normativa nº 35, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Estéreis. **Diário Oficial da União**, 2019b.

BONETTA, S. A. et al. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. **Environmental monitoring and assessment**, v. 161, n. 1-4, p. 473-483, 2010.

BRITO, R. L. de; FLEXA, R. G. C. Objetivos estratégicos de Agências Reguladoras em Saúde: um estudo comparativo internacional. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology) – Visa em Debate**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 3-13, 2019.

CAPANEMA, Luciana Xavier de Lemos. A indústria farmacêutica brasileira e a atuação do BNDES. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 23, p. 193-215, 2006.

CUNDELL, Anthony M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

FDA. Food and Drug Administration. **Drug Recalls: 2018-2019**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/drug-recalls>>. Acesso em 30 de maio de 2020.

GEBALA, Barbara; SANDLE, Tim. Comparison of different fungal agar for the environmental monitoring of pharmaceutical-grade cleanrooms. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 67, n. 6, p. 621-633, 2013.

GORDON, Oliver; BERCHTOLD, Manfred; STAERK, Alexandra; ROESTI, David. Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 68, n. 5, p. 394-406, 2014.

ISO. International Organization for Standardization. **Cleanrooms and associated controlled environments – Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration**. ISO 14644-1, 2015.

MAHNERT, Alexander; VAISHAMPAYAN, Parag; PROBST, Alexander J.; AUERBACH, Anna; MOISSEL-EICHINGER, Christine; VENKATESWARAN, Kasthuri; BERG, Gabriele. Cleanroom maintenance significantly reduces abundance but not diversity of indoor microbiomes. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0134848, 2015.

MISTRY, Mr Hardik; VAISHNAV, Ms Vini; GAMADIA, Ms Shalin. Environment Monitoring, Result Evaluation and Common Contaminants Study of Vaccine Manufacturing Facility. **International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology**, v. 8, n. 1, p. 605-614, 2020.

NAGAICH, Upendra; SADHNA, Divya. Drug recall: An incubus for pharmaceutical companies and most serious drug recall of history. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 5, n. 1, p. 13–19, 2015.

PASTUSZKA, Jozef S. et al. Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 22, p. 3833-3842, 2000.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; PINTO, Antônio F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4th ed. **Editora Manole**, 2015.

SANDLE, Tim. Environmental monitoring risk assessment. **Journal of GXP Compliance**, v. 10, n. 2, p. 54-74, 2006.

SANDLE, Tim. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, n. 4, p. 392-403, 2011.

SIBLEY, Christopher D.; PEIRANO, Gisele; CHURCH, Deirdre L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 3, p. 505-521, 2012.

STAL, Eva; CAMPANÁRIO, Milton de Abreu. Empresas multinacionais de países emergentes: o crescimento das multilatinas. **Economia global e gestão**, v. 15, n. 1, p. 55-73, 2010.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 42th ed. Washington: **United States Pharmacopeial Convention**. NF37, p. 7695, 2019.

UTESCHER, Carla Lílian de Agostini et al. Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 710-716, 2007.

VIJAYAKUMAR, R.; SANDLE, T.; MANOHARAN<sup>o</sup>, C. A review on fungal contamination in pharmaceutical products and phenotypic identification of contaminants by conventional. **European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 4-18, 2012.