



# **Estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica relativo à produção de uma nova vacina recombinante contra febre amarela**

**Lucas dos Santos Silva**

## **Projeto de Final de Curso**

**Orientadoras**

**Profa. Leda dos Reis Castilho**

**Profa. Flávia Chaves Alves**

**Dezembro de 2020**

# **Estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica relativo à produção de uma nova vacina recombinante contra febre amarela**

*Lucas dos Santos Silva*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

---

Fábio de Almeida Oroski, D.Sc.

---

Tânia Pato Cunha, D.Sc.

Orientado por:

---

Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

---

Flávia Chaves Alves, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Dezembro de 2020

Silva, Lucas dos Santos

Estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica relativo à produção de uma nova vacina recombinante contra febre amarela/ Lucas dos Santos Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2019.

Projeto Final – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2019.  
Orientadores: Leda dos Reis Castilho e Flávia Chaves Alves.

1. Avaliação técnico-econômica. 2. Vacina recombinante para febre amarela.  
3. Partículas pseudovirais ou *virus-like particles* (VLPs). 4. Projeto Final. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Leda dos Reis Castilho e Flávia Chaves Alves.

*“A educação é um elemento importante na luta pelos direitos humanos. É o meio para ajudar os nossos filhos e as pessoas a redescobrirem a sua identidade e, assim, aumentar o seu auto-respeito. Educação é o nosso passaporte para o futuro, pois o amanhã só pertence ao povo que prepara o hoje.”*

**Malcom X**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, não poderia deixar de agradecer às pessoas que tornaram este momento possível, meus pais. Mesmo com sua origem humilde, sem ter a oportunidade de uma educação formal, eles sempre fizeram o possível e o impossível para que eu tivesse acesso aquilo que lhes foi negado, uma educação digna e de qualidade. Com sua sabedoria adquirida fora de ambientes acadêmicos, eles sempre reiteraram a importância da educação na minha formação como profissional, mas também como pessoa. Por isso, sou infinitamente grato a José Carlos de Souza Silva e Josiane Souza dos Santos, meus pais.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha noiva, Ana Beatriz, pelo companheirismo, por estar ao meu lado até nos momentos mais difíceis, por sua influência positiva em relação aos estudos, por todo o amor dado. Sem ela, eu provavelmente seria uma pessoa completamente diferente e talvez sequer tivesse me esforçado tanto para chegar onde estou hoje.

Agradeço aos meus fiéis companheiros de EPSJV e de vida, Vinícius, Caio, Abner, Rogerio, Rodrigo e Raphael, pois nossa união nos tornou muito maiores do seríamos separados.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial a minha tia Célia, uma segunda mãe para mim, minhas queridas madrinhas Vanda e Maria Selma e meu padrinho João. Obrigado por sempre me motivarem a ser uma pessoa melhor.

Agradeço às minhas orientadoras, Leda e Flávia, por toda dedicação, paciência e apoio ao longo de tanto tempo na elaboração deste trabalho. Vocês foram incríveis.

Agradeço à Alexandra Elbakyan, pelos seus serviços prestados em prol da democratização do acesso à ciência.

Por fim, gostaria de agradecer a diversos nomes que são de fato muito caros para mim e não poderia deixar de, minimamente, citá-los pela importância que tiveram e têm na minha vida e formação: Marden, Bianca, Camila, Fernanda, Manuela, Thayná, Wallas, Rayssa, Leonardo, Ellen, Thamires, Pedro, Mateus, Matheus, Fabiano, André, Tamires, Nathália, Yasmim, Hugo, Priscilla, Emanuele, Mônica, Virgínia, Walner, Gustavo, Paulo, Adriana, Bruna, Bruno, entre muitos outros nomes que gostaria de citar.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

**ESTUDO PRELIMINAR DE VIABILIDADE TÉCNICO-ECONÔMICA  
RELATIVO À PRODUÇÃO DE UMA NOVA VACINA CONTRA FEBRE  
AMARELA**

Lucas dos Santos Silva

Dezembro, 2020.

Orientadores: Profa. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Profa. Flávia Chaves Alves, D.Sc.

A febre amarela é uma doença viral de alta letalidade que é endêmica em vastas regiões da África e das Américas. Devastadora até o desenvolvimento de uma vacina na década de 1930, ainda hoje é responsável por 29.000-60.000 mortes por ano e causa surtos esporádicos, como na África em 2016 e no Brasil em 2017-2018. Além disso, há o risco de que o vírus se espalhe e inicie transmissão local em áreas ainda não-endêmicas, como evidenciado pelos casos importados para a China que ocorreram durante a epidemia na África em 2016.

A principal forma de combate à doença é a vacinação, sendo a vacina atual produzida com o vírus atenuados em ovos embrionados de galinha. Apesar de segura e eficaz, a vacina atual apresenta limitações, principalmente no que se refere ao aumento da escala de produção para atender as demandas em situações de surto, além de efeitos adversos raros, mas fatais. Assim, uma nova vacina e uma nova tecnologia de produção se mostram necessárias.

O presente trabalho analisa a oportunidade econômica da produção de uma nova vacina recombinante baseada em partículas pseudo-virais (VLPs) produzidas por células HEK293 em biorreatores. A partir de uma análise de mercado e projeção de demanda, a capacidade da planta foi definida em 40 milhões de doses anuais. Com base nesta capacidade produtiva e na síntese do processo realizada, os equipamentos foram dimensionados e consumo de matérias-primas necessárias foi calculado. O investimento total e os custos totais de produção foram calculados, resultando em um custo unitário por dose de US\$ 0,35.

Os dados obtidos para valor presente líquido (US\$ 19,68 milhões), taxa interna de retorno (19,76%) e tempo de retorno do investimento (6 anos a partir do início de operação da planta) indicaram o projeto como economicamente viável. Análises de sensibilidade

realizadas para estudar diferentes cenários indicaram que o preço de venda do produto, a quantidade de doses vendidas e o custo dos estudos clínicos são variáveis de grande impacto.

## ÍNDICE

<b>Capítulo 1 – Introdução</b> .....	13
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica</b> .....	16
2.1 Febre amarela.....	16
2.1.1 Histórico da doença.....	16
2.1.2 Aspectos clínicos.....	17
2.1.3 O vírus da febre amarela.....	18
2.1.4 Transmissão.....	20
2.1.4. Aspectos epidemiológicos.....	21
2.2 Vacina de febre amarela.....	25
2.2.1 Histórico.....	25
2.2.2 Características da vacina.....	26
2.2.2.1 Aspectos gerais.....	27
2.2.2.2 Eventos adversos.....	28
2.2.2.3 Processo Produtivo Atual.....	29
2.3 Partículas pseudo-virais (VLPs).....	32
2.4 Desenvolvimento de um produto biológico e assuntos regulatórios.....	34
<b>Capítulo 3 – Projeção de demanda</b> .....	37
3.1 Análise do mercado atual.....	37
3.1.1 Produtores e clientes.....	37
3.1.2 Oferta e Demanda Mundiais.....	40
3.1.3 Mercado nacional.....	42
3.2 Projeção de Demanda.....	44
<b>Capítulo 4 – Síntese do processo e dimensionamento dos equipamentos</b> .....	45
4.1. Etapas de <i>Upstream</i> .....	48
4.1.1 Propagação celular.....	48
4.1.2. Biorreator de produção.....	49
4.2. Etapas de downstream.....	53
4.2.1. Clarificação.....	54
4.2.2. Etapas cromatográficas.....	54

4.2.2.1 Etapa de captura – cromatografia de troca aniônica.....	55
4.2.2.2 Etapa de polimento - cromatografia multimodal .....	57
4.2.3. Inativação viral .....	58
4.3 Formulação e filtração esterilizante .....	59
4.4. Processamento final .....	61
<b>Capítulo 5 – Estimativa de Investimento, Custos de Produção e Viabilidade Econômica.....</b>	<b>62</b>
5.1. Planejamento e Horizonte Temporal do Projeto .....	63
5.2 Investimento Total do Projeto .....	63
5.2.1 Investimentos em desenvolvimento do processo, testes pré-clínicos e clínicos e assuntos regulatórios.....	64
5.2.2 Investimento total para implantação da planta produtiva .....	66
5.2.2.1 Custo de aquisição dos equipamentos principais .....	67
5.2.2.2 Custos de construção de áreas limpas .....	68
5.2.3 Cálculo do investimento total .....	70
5.3 Custos de produção .....	70
5.3.1 Custos das matérias-primas .....	71
5.3.2 Custo total de produção .....	73
5.4 Demonstração de resultados de exercício (DRE) .....	75
5.5 Fluxo de caixa.....	76
5.6 Valor presente líquido (VPL) .....	79
5.7 Taxa interna de retorno (TIR).....	80
5.8 Tempo de retorno ( <i>payback</i> ) .....	80
5.10 Análises de sensibilidade.....	81
5.10.1 Preço de venda .....	81
5.10.2 Número de doses comercializadas .....	82
5.10.3 Custo dos estudos clínicos .....	83
5.10.4 Valor do investimento fixo de construção da planta .....	85
5.10.5 Rendimento dos processos de purificação .....	86
<b>Capítulo 6 – Conclusões.....</b>	<b>87</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do genoma do vírus da febre amarela. As regiões que não são traduzidas foram representadas pelas linhas que saem das caixas. ....	19
Figura 2. Representação do genoma do vírus da febre amarela. As regiões que não são traduzidas foram representadas pelas linhas que saem das caixas. ....	20
Figura 3. Ciclos de transmissão da febre amarela. ....	21
Figura 4. Mapa das áreas de risco de transmissão da febre amarela na África. ....	22
Figura 5. Mapa das áreas de risco de transmissão de febre amarela na América do Sul e Caribe. ....	23
Figura 6. Série histórica do número de casos humanos confirmados de febre amarela no Brasil e sua letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, de 1980 à 2018. Os dados de 2018 correspondem a atualizações até 26 de setembro de 2018. ....	24
Figura 7. Fluxograma do processo de produção da vacina de febre amarela (1ª etapa). ....	30
Figura 8. Fluxograma do processo de produção da vacina de febre amarela (2ª etapa). ....	31
Figura 9. Previsão do número de doses de vacina contra febre amarela a ser comercializado mundialmente entre os anos de 2017 e 2026. ....	42
Figura 10. Fluxograma do processo produtivo para produção da vacina de VLPs contra febre amarela proposto. ....	46
Figura 11. Análise de sensibilidade em relação ao preço unitário da dose. ....	82
Figura 12. Análise de sensibilidade em relação ao número de doses comercializadas anualmente ....	83
Figura 13. Análise de sensibilidade em relação ao custo dos ensaios clínicos ....	84
Figura 14. Análise de sensibilidade em relação a variação no valor do investimento para construção da planta ....	85
Figura 15. Análise de sensibilidade em relação a variação no rendimento global dos processos de purificação ....	86

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais eventos adversos e sua frequência de aparecimento .....	29
Tabela 2. Produtores de vacinas contra febre amarela pré-qualificados pela OMS.....	39
Tabela 3. Fornecimento de doses de vacina contra febre amarela ao UNICEF em 2015 e previsão de fornecimento para 2016 e 2017. ....	40
Tabela 4. Quantidade de doses adquiridas e aplicadas pelo Ministério da Saúde do Brasil no período de 2004 a 2018, com seus respectivos anos de aquisição e preço unitário. ....	43
Tabela 5. Volumes dos recipientes utilizados na propagação do inóculo e concentrações de células inoculadas e no final de cada etapa de propagação.....	49
Tabela 6. Etapas de purificação com seus rendimentos individuais e rendimento total. ....	52
Tabela 7. Equipamentos utilizados nas etapas de upstream .....	53
Tabela 8. Equipamentos para preparo e armazenamento de soluções utilizadas no processo cromatográfico. ....	55
Tabela 9. Parâmetros utilizados para dimensionamento e operação da coluna de cromatografia de troca aniônica. ....	56
Tabela 10. Volumes das soluções utilizadas na etapa de cromatografia de troca aniônica. Os valores estão apresentados em volumes de coluna (VC), isto é, 20 VC representa 20 vezes o volume da coluna utilizada. ....	57
Tabela 11. Parâmetros de dimensionamento do volume de resina multimodal e do diâmetro da coluna de cromatografia e seus valores calculados.....	58
Tabela 12. Volumes das soluções utilizadas na etapa de cromatografia multimodal. ....	58
Tabela 13. Formulação de algumas vacinas recombinantes de VLPs comerciais. ....	60
Tabela 14. Planejamento das etapas de desenvolvimento da vacina recombinante contra febre amarela, construção da planta produtiva e vida útil da planta. ....	64
Tabela 15. Custos das etapas de desenvolvimento, testes pré-clínicos e clínicos e assuntos regulatórios.....	65
Tabela 16. Estimativa do investimento total.....	67
Tabela 17. Equipamentos principais do processo e custos de aquisição .....	68
Tabela 18. Classificação europeia de áreas limpas .....	69
Tabela 19. Custo total de construção de áreas limpas .....	69
Tabela 20. Investimento Total do Projeto.....	70
Tabela 21. Estimativa do custo total de produção.....	71
Tabela 22. Custo anual das matérias-primas e acessórios utilizados na produção .....	72

Tabela 23. Custo total de produção da vacina recombinante contra febre amarela sem considerar o processamento final .....	73
Tabela 24. Custo total de produção da vacina recombinante contra febre amarela considerando o processamento final.....	74
Tabela 25. Demonstração de resultados do exercício do projeto.....	76
Tabela 26. Fluxo de caixa durante o desenvolvimento do processo e do produto e a construção da planta .....	77
Tabela 27. Fluxo de caixa durante a operação da planta produtiva .....	78

## Capítulo 1 – Introdução

É crescente a preocupação global com a febre amarela nos últimos anos, sobretudo após os recentes surtos da doença em Angola e na República do Congo em 2016 e, mais recentemente, no Brasil em 2017-2018. A febre amarela desperta um novo alerta mundial, não só pela sua alta letalidade e difusão na África e nas Américas, mas também pela possibilidade de começar a se espalhar e iniciar uma transmissão local em áreas ainda não-endêmicas, possibilidade esta que ficou evidente com os casos importados para a China que ocorreram durante a epidemia na África em 2016 (WHO, 2018a).

A atividade humana tem um papel fundamental no ressurgimento da febre amarela no cenário mundial. Fatores como o movimento humano no interior de florestas, com intuito de promover o desmatamento da área, na busca de atividades de mineração ou de preparo da área para agricultura, submetem seres humanos a um contato maior com os reservatórios animais do vírus (primatas não humanos) e com os mosquitos transmissores. Além disso, o aumento da facilidade e da frequência de deslocamento de grupos humanos, aliados à crescente agregação populacional em centros urbanos também favorece a mudança no perfil de transmissão da febre amarela. Todos esses fatores, somados a mudanças climáticas ocorridas nas últimas décadas, contribuíram para um ressurgimento do vetor primário em ciclos urbanos - mosquitos da espécie *Aedes aegypti* - fortalecendo a ocorrência de surtos não só de febre amarela, mas também de outras arboviroses ao redor do mundo como dengue, zika e chikungunya (WHO, 2018a).

Dado esse cenário mundial referente à febre amarela, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima um aumento substancial na demanda da vacina e coloca o aumento da produção como uma das metas a ser alcançada a fim de eliminar a doença, prevendo cerca de 1,38 bilhões de doses como necessárias para tal (WHO, 2018b).

O controle da proliferação do mosquito, embora seja uma medida a ser incentivada, se limita à circulação urbana do vetor e representa um grande desafio no controle da transmissão (WHO, 2018a). Sendo assim, a vacinação coloca-se como a medida de prevenção mais importante, recomendada a residentes de áreas endêmicas e pessoas que viajam a essas áreas. Uma vacina para a febre amarela está disponível desde a década de 1930, tendo sido desenvolvida a partir do vírus da febre amarela atenuado e sendo produzida em ovos embrionados de galinha. Desde então, essa tem sido a única principal plataforma de produção da vacina, responsável pela imunização segura e eficaz milhões de pessoas (PATO et al., 2019).

Apesar da vacina atual ser segura e eficaz, além de ter um custo baixo para os países endêmicos, existem alguns problemas associados a ela. Um deles diz respeito à ocorrência de alguns efeitos adversos raros, mas que podem ser fatais. Destaca-se, nesse contexto, o desenvolvimento de algumas doenças, como a doença neurológica associada à vacina de febre amarela (YEL-AND) e doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela (YEL-AVD), além de reações anafiláticas, em geral associadas com alergias à proteína do ovo ou a gelatinas, presentes na produção da vacina (HAYES, 2010).

Outra dificuldade é inerente ao processo produtivo atual e diz respeito ao aumento da escala de produção, limitada pela utilização dos ovos embrionados. No contexto atual e futuro, isso representa um grave problema, sobretudo no que tange à incapacidade de atender a demandas aumentadas em situações de surtos.

Apresentados esses problemas, uma nova vacina e uma nova tecnologia de produção se mostram necessárias, não só no sentido de aumentar a cobertura vacinal para grupos específicos que não podem receber a vacina atual (crianças abaixo do 9 meses, imunossuprimidos, pessoas com alergia à proteína do ovo, lactantes e pessoas acima dos 60 anos) como também para empregar um processo produtivo passível de aumento de escala em situações de surto. Assim, a produção da vacina não replicativa através de uma tecnologia baseada em cultura de células em biorreator torna-se uma alternativa interessante para contornar os problemas atuais (PATO et al., 2019). Um processo de produção em biorreatores garante maior esterilidade além de poder ser mais facilmente escalonado e monitorado (GALLO RAMIREZ et al., 2015).

Uma das tecnologias alternativas para a produção da vacina seria uma vacina recombinante baseada em partículas pseudo-virais (VLPs, do inglês *virus-like particles*). VLPs são estruturas multiproteicas tridimensionais que mimetizam a organização e a conformação de um vírus nativo, exceto que não possuem o genoma viral. Essa característica, em tese, permite que essas partículas possam ativar a resposta imunológica e promover a produção de anticorpos, fazendo das VLPs excelentes candidatos para a produção de vacinas (ROLDÃO et al., 2010).

Portanto, o presente trabalho se propõe a avaliar a viabilidade da implantação de uma nova plataforma de produção para a vacina de febre amarela baseada na tecnologia de VLPs, partindo da síntese do processo produtivo com base nos trabalhos experimentais desenvolvidos no LECC/COPPE/UFRJ (ALVIM; ITABAIANA; CASTILHO, 2019; LIMA; SOUZA; CASTILHO, 2019; ALVIM et al., 2020), dimensionando-o e realizando a análise de viabilidade econômica.

A estrutura do trabalho está dividida em 5 capítulos, além dessa introdução. No capítulo 2 será feita uma revisão bibliográfica dos temas que permeiam o trabalho, apresentando os conceitos sobre a febre amarela, o vírus causador, a vacina atual, partículas pseudo-virais, entre outros. No capítulo 3 será realizado um estudo da demanda para uma vacina de febre amarela, considerando tanto o mercado nacional quanto o mercado internacional. A partir da demanda projetada, será realizada a síntese do processo e o dimensionamento dos equipamentos no capítulo 4. No capítulo 5, serão realizadas as análises de viabilidade econômica e de sensibilidade. Por fim, no capítulo 6 serão apresentadas as conclusões do trabalho, limitações e sugestões para trabalhos futuros.

## Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

O presente capítulo tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica dos temas relacionados ao trabalho. Dessa forma, serão apresentados aspectos gerais sobre a febre amarela, sobre a vacina disponível e seu processo de produção atual, sobre as VLPs e sobre o desenvolvimento de um produto biológico presentes na literatura.

### 2.1 Febre amarela

#### 2.1.1 Histórico da doença

A febre amarela é uma doença viral aguda causada por um vírus de ácido ribonucleico (RNA) da família *Flaviviridae*, transmitido por mosquitos das espécies *Sabethes*, *Haemagogus* e *Aedes* (XAVIER et al., 2018). É uma das doenças virais mais alarmantes da história da humanidade tendo sido responsável por diversos surtos ao redor do mundo, causando a morte de milhares de pessoas e um forte impacto econômico-social em diversos países.

Acredita-se que o vírus da febre amarela tenha surgido no continente africano cerca de 3000 anos atrás e tenha sido exportado para as Américas através do tráfico de escravos africanos, comumente praticado a partir do século XVI (CHIPPAUX; CHIPPAUX, 2018). Entretanto, os primeiros relatos escritos da febre amarela datam do século XVII através de manuscritos maias que descrevem uma epidemia em Yucatan (MONATH, 2009). Ainda no século XVII, diversos surtos foram reportados na costa leste dos Estados Unidos, incluindo cidades como Nova Iorque (1668), Boston (1691) e Charleston (1699).

Com o constante tráfego marítimo devido ao comércio, a febre amarela se espalhou para a Europa no início do século XVIII, tendo um dos principais surtos ocorrido na cidade de Cádiz, na Espanha, em 1730, causando a morte de cerca de 2.200 pessoas. A epidemia de Cádiz foi seguida de surtos em outros países europeus como França e Inglaterra. Entretanto, entre os séculos XVII e XIX, a febre amarela representou um problema maior principalmente nas Américas e no oeste da África. Nesse contexto, destaca-se surtos importantes como o ocorrido na Filadélfia (1793), onde 10% da população veio a óbito, e no Vale Mississipi (1878) onde 20.000 pessoas morreram (MONATH, 2009).

No início dos anos de 1900, Walter Reed, major do exército dos Estados Unidos, junto com uma comissão de pesquisadores e médicos (mais conhecida como a Comissão de Reed), liderou experimentos para comprovar a hipótese do médico cubano Finlay, de que a febre amarela era uma doença transmitida por mosquitos. A hipótese foi comprovada e a comissão isolou um vírus, que foi apontado como causador da doença, enquanto os mosquitos foram

posteriormente identificados como pertencendo à espécie *Aedes aegypti* (MEHRA, 2009; MONATH, 2009). Ao longo da primeira década do século XX muitos trabalhos confirmaram os achados da Comissão de Reed, exceto no que dizia respeito ao agente causador. A partir desse ponto, os esforços se voltaram para o isolamento e a identificação do agente causador da doença. Nesse sentido, em 1925, a Fundação Rockefeller estabeleceu a *West African Yellow Fever Commission* (Comissão da Febre Amarela do Oeste Africano), em Lagos, Nigéria, com objetivo de elucidar o agente causador da doença. O trabalho da Comissão foi capaz de isolar a cepa Asibi (nome dado em homenagem ao paciente que cedeu o sangue à pesquisa) do vírus da febre amarela, em 1928, confirmando o agente causador como sendo um vírus. Em paralelo, Constantin Mathis e Jean Laigret, do Instituto Pasteur Dakar (Senegal) conseguiram isolar também um vírus, dando origem à cepa “francesa” do vírus. O isolamento dessas cepas foi essencial para o desenvolvimento das primeiras vacinas para a febre amarela. (MONATH, 2009). Um breve histórico sobre o desenvolvimento da vacina será abordado mais adiante neste capítulo.

O desenvolvimento das vacinas e das campanhas de vacinação contra a febre amarela foi de vital importância para controlar a disseminação da doença e evitar a morte de milhões de pessoas ao redor do mundo. No entanto, a demanda pela vacina tem se mostrado crescente nas últimas décadas e a febre amarela ainda representa um risco global, sobretudo na África e na América do Sul ou caso venha a ocorrer transmissão local do mesmo em novas regiões do mundo onde o vetor (mosquito) já é endêmico, como na Ásia e parte da América do Norte.

### **2.1.2 Aspectos clínicos**

A infecção pelo vírus da febre amarela pode se apresentar de formas diversas, tanto assintomáticas como sintomáticas. Infecções assintomáticas ou subclínicas representam a maior parte dos casos e só são detectadas através de diagnósticos laboratoriais específicos. As manifestações sintomáticas podem ser classificadas como brandas, moderadas ou severas (XAVIER et al., 2018).

Nas formas brandas da doença há aparecimento de sintomas inespecíficos como astenia, cefaleia e febre moderada, com melhora em até dois dias com o uso de sintomáticos, antitérmicos e analgésicos, ocorrendo em 20-30% dos casos (BRASIL, 2017). Nos casos moderados, além dos sintomas apresentados, pode haver ocorrência de náusea, mialgia e artralgia, sem comprometer a locomoção do paciente. Pelo menos um dos sintomas da tríade

clássica pode aparecer, sendo eles oligúria/anúria<sup>1</sup>, icterícia<sup>2</sup> e hematêmese<sup>3</sup>. Em geral, a recuperação ocorre em dois ou três dias, com evolução do quadro sem complicações ou sequelas (XAVIER et al., 2018).

De um modo geral, a evolução do quadro da febre amarela se dá em duas fases. A primeira fase ou período de infecção corresponde às manifestações brandas e moderadas (BRASIL, 2004). O período de infecção dura entre 3 e 6 dias e é imediatamente seguido por um período de remissão, onde os sintomas desaparecem e há sensação de melhora pelo paciente. Nas formas brandas e moderadas da doença, após o período de remissão, que tem duração entre 2 e 48 horas, há um período de recuperação. Em manifestações mais severas, após o período de remissão, há a entrada na segunda fase ou período de intoxicação (PAHO, 2005).

As formas severas possuem alta letalidade (entre 20 e 50%) e os pacientes manifestam a tríade clássica de sintomas: oligúria/anúria (que leva a um quadro de insuficiência renal), icterícia (em decorrência de insuficiência hepática) e manifestações hemorrágicas (epistaxe, melena e principalmente hematêmese). O óbito ocorre normalmente após 6 ou 7 dias do início dos sintomas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2017; XAVIER et al., 2018).

O tratamento é apenas sintomático, com o paciente permanecendo sob hospitalização, com reposição de líquidos e das perdas sanguíneas. Nos casos mais graves, é indicado que os pacientes permaneçam em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para reduzir as complicações e o risco de óbito (BRASIL, 2018a).

O diagnóstico clínico da doença muitas vezes é difícil, especialmente porque em casos brandos e moderados os sintomas são, normalmente, inespecíficos, fazendo com que se possa confundir o diagnóstico com outras doenças, especialmente outras viroses. O diagnóstico laboratorial é realizado através de amostras de sangue, soro ou biópsias de órgãos (rins, fígado, coração, baço e pulmão). É essencial a associação do diagnóstico laboratorial com o diagnóstico clínico para que seja confirmado o diagnóstico final (XAVIER et al., 2018).

### **2.1.3 O vírus da febre amarela**

O vírus responsável pela febre amarela (VFA) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, apresentando assim características de tamanho e organização do genoma muito

---

<sup>1</sup> Oligúria é definida como a diminuição da produção de urina (diurese), enquanto anúria é definida como a ausência da diurese (SILVA; SIMÕES, 2010).

<sup>2</sup> Icterícia é um sinal clínico caracterizada pela coloração amarelada da pele e mucosas causada pela elevação dos níveis de bilirrubina no sangue (SPIRITO; LOT, 2009).

<sup>3</sup> Hematêmese é o nome dado à saída de sangue pela boca tendo como origem o trato gastro-intestinal, conhecida habitualmente como “vômito de sangue”.

semelhantes a outros vírus de importância para a saúde pública, como o vírus da dengue, o vírus zika, entre vários outros. O genoma do VFA é uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, que apresenta os seguintes componentes, em ordem de tradução: uma região que não é traduzida na extremidade 5' (118 bases), três proteínas estruturais, do capsídeo (C), de premembrana/membrana (prM/M) e do envelope (E), sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e uma outra região não traduzida na extremidade 3' (507 bases) (BECK, 2015). A Figura 1 mostra uma representação do genoma do VFA.

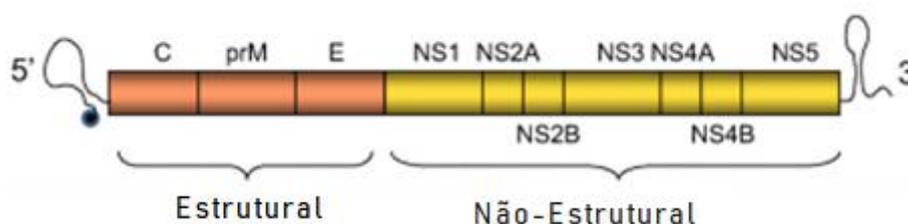


Figura 1. Representação do genoma do vírus da febre amarela. As regiões que não são traduzidas foram representadas pelas linhas que saem das caixas.

Adaptado de: GARDNER; RYMAN, 2010

As proteínas não estruturais possuem funções diversas, sendo essenciais para todo o ciclo de replicação do vírus, atuando em funções desde virulência e patogenicidade até a formação do complexo de replicação (GARDNER; RYMAN, 2010).

Já as proteínas estruturais, como o próprio nome sugere, têm a função de formar a estrutura do vírus. Em sua forma madura, os vírions – partículas virais completas – possuem formato icosaédrico e compreendem o nucleocapsídeo recoberto por heterodímeros formados por glicoproteínas E e por proteínas de membrana (GARDNER; RYMAN, 2010). As partículas possuem cerca de 40 nm e têm como principal componente a glicoproteína E, a qual exerce um importante papel na atividade infecciosa do vírus, sendo responsável pela ligação entre a célula e a superfície viral e pela fusão ao endossomo da célula hospedeira, entre outras funções (GARDNER; RYMAN, 2010; BECK, 2015). Uma representação do vírus é apresentada na Figura 2.

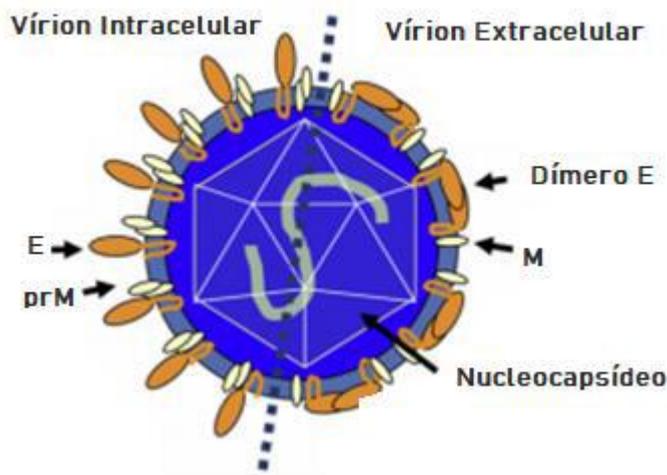


Figura 2. Representação do genoma do vírus da febre amarela.

Adaptado de: GARDNER; RYMAN, 2010.

#### 2.1.4 Transmissão

O VFA é um arbovírus, isto é, é um vírus transmitidos por artrópodes a outros seres vivos (LOPES, NOZAWA, LINHARES, 2014). O VFA é transmitido a seres humanos e animais pela picada de mosquitos hematófagos dos gêneros *Aedes*, *Haemogogus* e *Sabethes*, sendo que os diferentes gêneros habitam locais diferentes – alguns têm como habitat centros urbanos (domésticos), outros vivem apenas em ambiente de selva (selvagens), e alguns conseguem habitar ambos (semi-domésticos) (WHO, 2018a).

Originalmente, a doença possui três ciclos de transmissão: um selvagem, um intermediário e um urbano. No ciclo selvagem, os reservatórios naturais do vírus da febre amarela, os primatas não humanos, são picados por mosquitos selvagens dos gêneros *Aedes*, *Sabethes* ou *Haemogogus*, que por sua vez transmitem o vírus a humanos (os quais, nesse ciclo, são hospedeiros acidentais) que transitam por uma área de selva. No ciclo intermediário ou de savana, humanos e primatas não humanos são picados por mosquitos semi-domésticos do gênero *Aedes* que transitam entre áreas de floresta e assentamentos humanos próximos, como pequenos vilarejos e áreas rurais. Esses mosquitos por sua vez, transmitem o vírus para outros humanos não infectados, propagando o ciclo. Esse ciclo é especialmente relevante na África, sendo responsável pela maioria dos surtos da doença no continente. Por último, no ciclo urbano, o vírus é introduzido em zonas densamente povoadas por seres humanos infectados com o vírus. Nesse ciclo, mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são responsáveis pela transmissão do vírus de

ser humano para ser humano (WHO, 2018a). A Figura 3 apresenta um esquema dos três ciclos de transmissão da febre amarela.

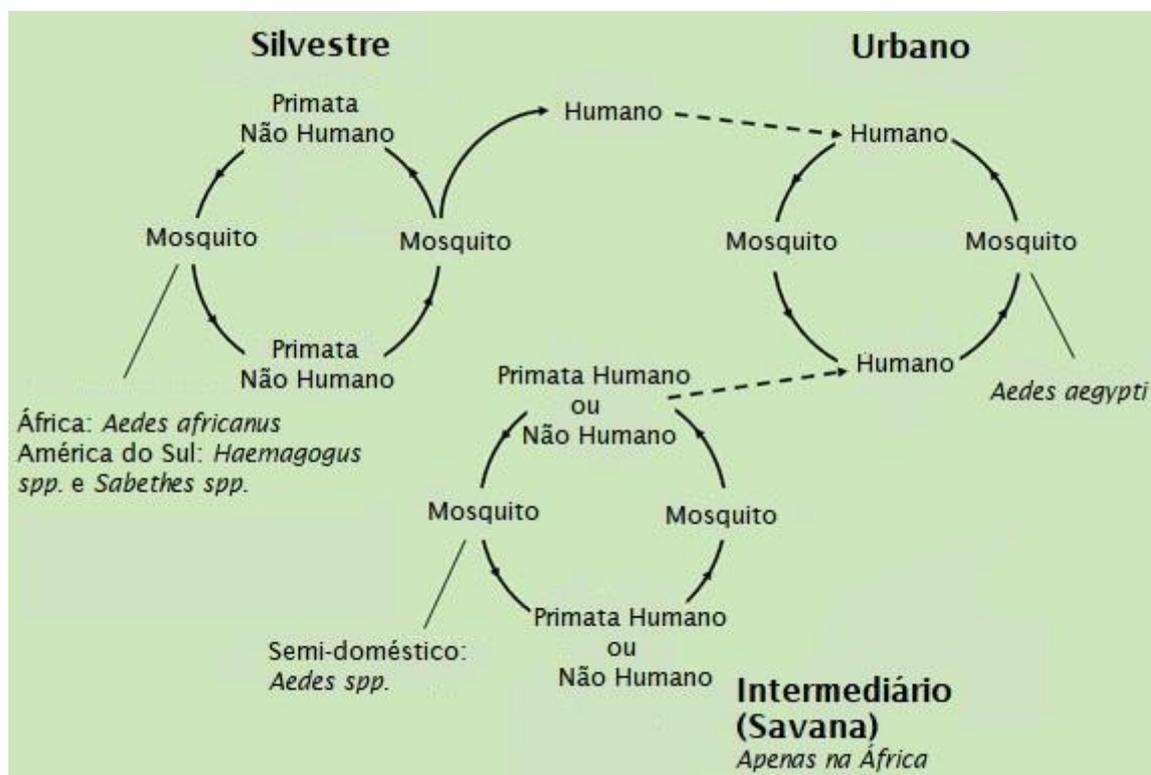


Figura 3. Ciclos de transmissão da febre amarela.

Adaptado de: CDC, 2019c.

#### 2.1.4. Aspectos epidemiológicos

Em termos de distribuição geográfica, a febre amarela é uma doença predominantemente tropical, sendo a América do Sul e a África as principais áreas endêmicas da doença. Ao todo, são 47 países onde há risco de transmissão da febre amarela. Entre eles, 13 países se localizam na América do Sul e Caribe (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trindad e Tobago e Venezuela) e são consideradas áreas com risco de transmissão. Na África, há 29 países considerados áreas com risco de transmissão (Angola, Benin, Burúndi, Camarões, República Centro-Africana, Chade, República do Congo, Costa do Marfim, Congo, República Democrática do Congo, Guiné Equatorial, Etiópia, Gabão, Gâmbia, Gana, Guiné, Guiné-Bissau, Quênia, Libéria, Mali, Mauritânia, Níger, Nigéria, Ruanda, Senegal, Serra Leoa, Sudão, Togo, Uganda) e outros 5 considerados áreas com baixo potencial de transmissão (Eritreia, São Tomé, Somália, Tanzânia e Zâmbia) (CDCa, 2019). A recomendação de vacinação reflete esta classificação de risco, conforme mostram as Figuras 4 e 5 para África e América do Sul e Caribe, respectivamente.



Figura 4. Mapa das áreas de risco de transmissão da febre amarela na África.

Adaptado de: CDC, 2019b

Olhando exclusivamente para o Brasil, é possível observar que a febre amarela representa um risco para quase todos os estados do país, com a vacinação não sendo recomendada, até o final de 2019, apenas para alguns poucos estados na região Nordeste. Além disso, é possível observar também uma delimitação de novas áreas onde a recomendação de vacinação foi atualizada após o último surto da doença, em 2017, que levou a transmissão e circulação da febre amarela a áreas, até então, não endêmicas, sobretudo a região Sudeste do país, que apresentou o maior número de casos da doença durante o último surto (BRASIL, 2018a). Em 2020, o Ministério da Saúde ampliou a área de recomendação de vacinação para todo o território do país, englobando as regiões do Nordeste onde a vacinação não era recomendada (BRASIL, 2019b).



Figura 5. Mapa das áreas de risco de transmissão de febre amarela na América do Sul e Caribe.

Adaptado de: CDC, 2019b.

No Brasil, a febre amarela apresenta um padrão de aparecimento irregular, com longos períodos de estabilidade – com casos isolados da doença – alternando com períodos epidêmicos, onde a doença reemerge e o vírus aumenta sua circulação em áreas de baixa ou nenhuma cobertura vacinal, ocasionando surtos (SBI, 2017). Esses processos de reemergência da febre amarela no país produziram diversos e extensos surtos durante as últimas duas décadas, afetando humanos e primatas não- humanos. Os mais recentes foram os ocorrido entre 1998 e 2003, que se espalhou da região Norte (Pará; 1998/1999) ao Sudeste (Minas Gerais; 2002/2003)

e Sul (Rio Grande do Sul; 2002/2003), o surto entre 2007 e 2009, partindo do Norte/Centro Oeste (2007/2008) ao Sudeste (São Paulo; 2008/2009) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul; 2008/2009) e o recente surto de dezembro de 2016 até 2018, tendo como principal foco a região Sudeste (BRASIL, 2018a).

Esse padrão irregular de aparecimento da doença pode ser observado na Figura 6 que mostra o número de casos humanos da febre amarela no Brasil entre os anos de 1980 e 2018, assim como a taxa de letalidade nos respectivos anos.

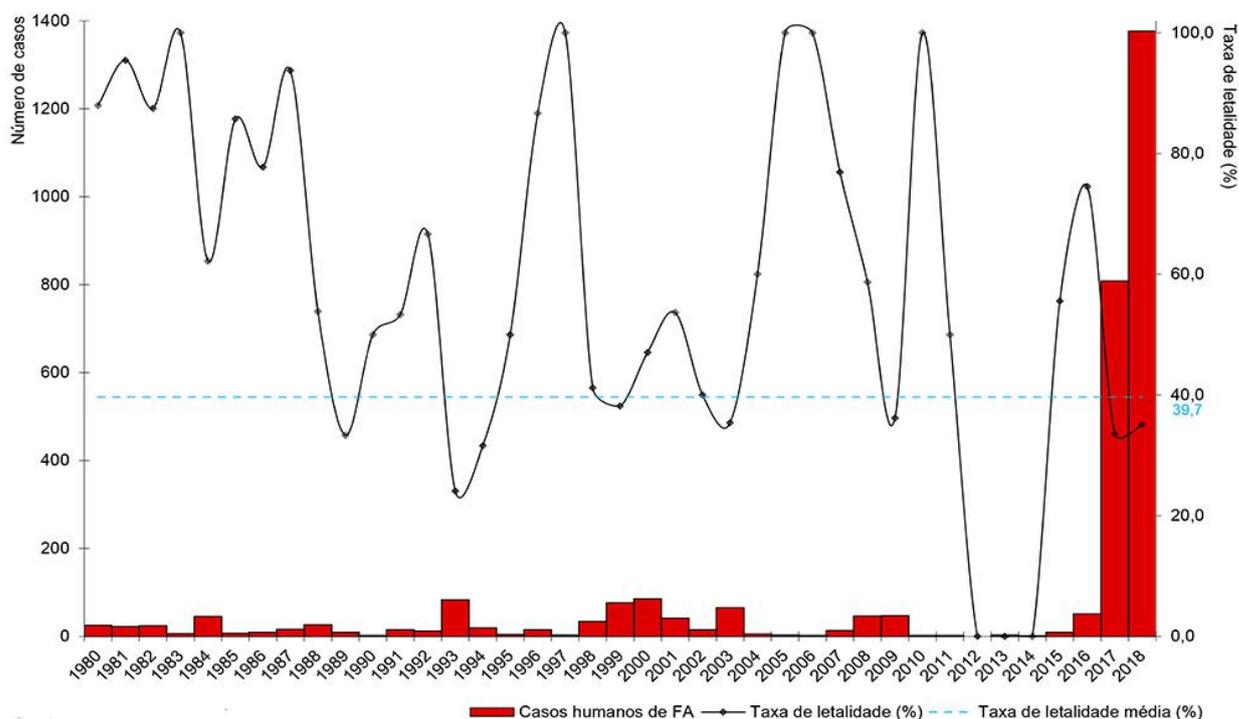


Figura 6. Série histórica do número de casos humanos confirmados de febre amarela no Brasil e sua letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, de 1980 à 2018. Os dados de 2018 correspondem a atualizações até 26 de setembro de 2018.

Fonte: BRASIL, 2018a

A partir dos dados apresentados na Figura 6, pode-se observar que a letalidade média da doença, no Brasil, no período avaliado, é de 39,7% entre os casos com confirmação através de diagnóstico laboratorial, ou seja, sem incluir os casos não notificados. Também pode-se observar um aumento significativo (em uma ordem de grandeza) do número de casos confirmados no surto recente em relação a todo histórico desde 1980, o que mostra um maior contato entre o vírus e os seres humanos e acende um alerta para o Ministério da Saúde e para o governo brasileiro no que diz respeito ao controle da doença.

Outra preocupação, dessa vez em escala mundial, é a propagação do vírus da febre amarela para áreas onde o mesmo não circula. Esse fenômeno já vem sendo observado no Brasil desde o último surto a partir de novembro de 2016, quando o vírus se espalhou rapidamente pela região Sudeste atingindo, em menos de um ano, quatro dos estados mais populosos do país (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo), que até então não estavam incluídos na área recomendada para vacinação. Uma das possíveis razões para isso é a disseminação crescente dos vetores da doença, em especial o *Aedes aegypti*, evidenciado por outros surtos de transmissão de doenças virais ocorridas no mesmo período, como zika e chikungunya (POSSAS et al., 2018; PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C, 2017). A possibilidade da ampliação da área de circulação do vírus para novos territórios, especialmente na Ásia, é ilustrada também com a aparição de 11 casos confirmados da doença importados da África para a China em 2016 (WHO, 2018a) o que torna o cuidado ainda maior devido à grande densidade populacional no continente asiático.

## **2.2 Vacina de febre amarela**

### **2.2.1 Histórico**

Com o isolamento do vírus da febre amarela no final dos anos 1920, surgiram diversas tentativas de desenvolver uma vacina eficaz contra a doença. Inicialmente, os esforços estavam voltados para o desenvolvimento de formas de imunização contendo o vírus inativado. As primeiras abordagens utilizavam tecidos animais infectados com o vírus, posteriormente tratados quimicamente para promover sua inativação. No entanto, grande parte das metodologias que surgiram no fim da década não conseguiu produzir uma vacina eficiente, obtendo preparações inconsistentes, em grande parte devido às limitações técnicas da época, como o controle da propagação e da inativação viral (MONATH, 2009).

A partir do trabalho de Max Theiler em 1929 – que conseguiu promover uma boa propagação viral ao injetar o material em cérebros de camundongos – foi obtido o conhecimento de que múltiplas passagens eram capazes de diminuir o viscerotropismo<sup>4</sup> e o dano hepático quando o vírus era injetado em macacos *Rhesus*, apesar de um aumento do neurotropismo<sup>5</sup>. Em outras palavras, o trabalho deu origem a cepas atenuadas, que serviram de base para a criação das primeiras vacinas eficientes (FRIERSON, 2010).

---

<sup>4</sup> Viscerotropismo é a capacidade do vírus da febre amarela de infectar e provocar lesões no fígado, baço, rins e coração (SPSP, 2017).

<sup>5</sup> Neurotropismo é a capacidade do vírus da febre amarela de infectar e lesar o parênquima cerebral (SPSP, 2017).

Assim, em 1931, o Instituto Rockefeller desenvolveu uma vacina utilizando a cepa “francesa”, atenuada após mais de 100 passagens em cérebros de ratos, associada a soro humano imunizado. Essa preparação obteve sucesso e foi utilizada pelo Instituto para imunizar os pesquisadores que trabalhavam nos projetos de febre amarela. Entretanto, a obtenção do soro humano era problemática e as tentativas para substituí-lo por soro animal introduziram novas preocupações como custo e possíveis novas reações adversas. Adicionalmente, dificuldades técnicas na padronização de condições de produção e no controle da neutralização *in vitro* das misturas vírus/soro inviabilizavam o uso em uma escala ampliada, sendo necessária uma nova abordagem de produção (MONATH, 2009).

Ainda no Instituto Rockefeller, Theiler e Eugen Hagggen conseguiram estabelecer o cultivo do vírus da febre amarela em embriões de camundongo e galinha, o que seria o primeiro passo para o desenvolvimento da metodologia de produção atual. A partir disso, Hugh Smith trabalhando com a cepa Asibi, foi capaz de desenvolver uma cepa suficientemente atenuada e segura para ser testada, sem a necessidade do uso do soro imune. Essa cepa, conhecida como 17D, foi obtida após 18 subculturas em embriões de camundongo, 52 subculturas em embriões de galinha e 128 subculturas em embriões de galinha após depleção do tecido nervoso e serviu de base para a vacina utilizada no mundo todo desde a década de 1930 (MONATH, 2009).

É importante salientar o surgimento de outra vacina na década de 1930, desenvolvida pelo Instituto Pasteur através do trabalho de Andrew Watson Sellards e Jean Laigret com a cepa “francesa”. Essa vacina não utilizava soro humano e era associada à vacina de varíola, sendo importante nos países francófonos da África, tendo, até 1953, sido distribuída à 56 milhões de pessoas (FRIERSON, 2010).

Após o fim da Segunda Guerra Mundial, tanto a vacina desenvolvida a partir da cepa 17D como da cepa “francesa” eram utilizadas em larga escala, porém, esse panorama foi alterado devido à ocorrência cada vez mais evidente de reações neurológicas associadas à vacina “francesa”, que foi descontinuada em 1982. Atualmente, todas as vacinas para febre amarela disponíveis são derivadas de duas subcepas da 17D, a 17DD e a 17D-204, obtidas, respectivamente, das subculturas 195 e 204 (MONATH, 2009; BARRETT, TEUWEN, 2009).

### **2.2.2 Características da vacina**

### 2.2.2.1 Aspectos gerais

A vacina de febre amarela é uma das vacinas virais mais bem estabelecidas e consolidadas no mercado biofarmacêutico, muito por conta de seu alto grau de segurança e eficácia, o que permitiu imunizar mais de 500 milhões de pessoas desde seu desenvolvimento (HAYES, 2010). Atualmente existem quatro produtores principais com certificado da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde um deles (BioManguinhos/Fiocruz) produz a vacina a partir da cepa 17DD atenuada e os demais (Instituto Pasteur Dakar, Sanofi Pasteur e Instituto Chumakov) utilizam a cepa 17D-204, também atenuada, na produção.

Tomando como base a vacina produzida por BioManguinhos, a vacinação consta no Programa Nacional de Imunização (PNI)<sup>6</sup> do Brasil, sendo recomendada a qualquer pessoa a partir dos 9 meses de idade, com um dose de reforço aos 4 anos de idade. Além disso, a vacinação também é recomendada a viajantes que têm áreas com recomendação de vacinação como destino, levando em conta o risco de contrair a doença e os riscos de eventos adversos pós-vacinais. A vacina de febre amarela possui as seguintes contraindicações, apresentadas na bula do produto (BIOMANGUINHOS, 2012):

- Pessoas com doença febril aguda, com comprometimento do estado geral de saúde;
- Pessoas abaixo dos 9 meses ou acima de 60 anos de idade;
- Pessoas com histórico de reações anafiláticas a ovos de galinha e derivados, gelatina, eritromicina e canamicina;
- Gestantes, a não ser em situação epidemiológica com alto risco de exposição, seguindo recomendações das autoridades de saúde;
- Pessoas com imunodeficiência congênita ou secundária por doença (neoplasias, AIDS e infecção pelo HIV com comprometimento da imunidade) ou por tratamento (drogas imunossupressoras acima de 2mg/kg/dia por mais de duas semanas, radioterapia etc.);
- Pessoas com histórico de doença do timo, como miastenia gravis, timoma ou timectomia.

A resposta imune primária, caracterizada pelo aparecimento de anticorpos de classe IgM, ocorre entre o 4º e o 7º dia após a vacinação, seguida por um aparecimento de anticorpos do tipo IgG. Entre 1 e 2 semanas após a vacinação, anticorpos neutralizantes começam a ser

---

<sup>6</sup> O Programa Nacional de Imunização, iniciado em 1973, é um programa do Ministério da Saúde com o objetivo de coordenar ações de imunização em todo território brasileiro. O Programa oferta atualmente 45 imunobiológicos distintos para a população brasileira (BRASIL, 2015b).

produzidos e atingem seu máximo entre a 3<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> semana pós-vacinação. Após isso, a imunidade persiste por, no mínimo, 10 anos e, segundo diversos artigos apontam, possivelmente por toda a vida (BIOMANGUINHOS, 2012; BARRETT; TEUWEN, 2009)

### **2.2.2.2 Eventos adversos**

Apesar de ser considerada um vacina segura e eficaz, existem alguns casos raros de eventos adversos decorrentes da vacinação. Eventos adversos muito comuns são aqueles que ocorrem em uma frequência acima de 10% dos pacientes que utilizaram o medicamento. Entre esses eventos estão cefaleia e mialgia. Os eventos adversos comuns são aqueles que ocorrem entre 1 e 10% das pessoas que recebem a vacinação. Geralmente são relatados entre o 3<sup>o</sup> e o 10<sup>o</sup> dia após a vacinação e entre eles constam dor, eritema, febre moderada, febre com temperatura acima dos 38,5°C e náusea. Os eventos adversos muito raros são aqueles com frequência de aparecimento abaixo de 0,01%. (BIOMANGUINHOS, 2012). Esses eventos normalmente são reações mais severas associadas à vacinação e podem ser:

- Doença viscerotrópica associada à vacina de febre amarela (YEL-AVD): doença semelhante à infecção do vírus nativo que ocorre com a disseminação do vírus vacinal para diversos órgãos, podendo levar à choques, derrames pleural e abdominal, falência múltipla de órgãos e morte (BIOMANGUINHOS, 2012). A doença foi inicialmente relatada em 2001 e, mesmo apresentando uma frequência rara de aparecimento, possui alta letalidade, sendo um dos eventos adversos mais severos associados à vacina de febre amarela;
- Doença neurológica associada à vacina de febre amarela (YEL-AND): pode se manifestar como encefalites, meningites, neuropatia, síndrome de Guillian-Barre, encefalomielite disseminada aguda ou mielite espinal. A fatalidade desse tipo de evento é relativamente baixa, exceto em bebês com idade inferior a 6 meses, onde o risco é elevado (de 0,5 a 4 a cada 1000 casos), o que leva à recomendação da vacinação ser feita apenas a partir dos 9 meses de idade (HAYES, 2010);
- Reações anafiláticas: as reações anafiláticas são eventos adversos raros associados às proteínas do ovo e outros componentes da vacina, como gelatina, canamicina e eritromicina (BIOMANGUINHOS, 2012; HAYES, 2010);
- Reações de hipersensibilidade: eventos adversos que ocorrem nas primeiras duas horas após a vacinação e podem se manifestar na forma de erupções cutâneas, urticária e broncoespasmo (BIOMANGUINHOS, 2012).

A Tabela 1 apresenta os principais eventos adversos com sua frequência de aparecimento para febre amarela.

Tabela 1. Principais eventos adversos e sua frequência de aparecimento

<b>Evento adverso</b>	<b>Frequência de aparecimento (%)</b>
Cefaleia	35,0
Mialgia	18,0
Dor	9,0
Eritema	2,0
Febre	8,0
Febre (>38,5°C)	7,0
Náusea	8,0
Reação de hipersensibilidade	0,0009
Reação anafilática	0,000023
Doença neurológica	0,0004
Doença viscerotrópica (< 60 anos)	0,0003
Doença viscerotrópica (> 60 anos)	0,001

Fonte: BIOMANGUINHOS, 2012

### 2.2.2.3 Processo Produtivo Atual

Toma-se como base de análise neste capítulo a vacina atenuada de febre amarela produzida por Biomanguinhos/Fiocruz no Laboratório de Febre Amarela (LAFAM), um dos produtores qualificados pela OMS a distribuir o produto internacionalmente.

O processo produtivo da vacina atenuada de febre amarela é um processo bem consolidado e que tem sua base técnico-científica remontando, ainda, ao início da produção dessa vacina, em meados do século XX, sofrendo algumas alterações ao longo dos anos para se adequar às Boas Práticas de Fabricação<sup>7</sup> (BPF) e garantir a produção de uma vacina mais segura e eficaz.

<sup>7</sup> Boas Práticas de Fabricação é a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. (ANVISA, 2010).

Em termos de processo, a preparação do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) se dá através da inserção do vírus atenuado em ovos de galinha recentes, férteis e livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *specific-pathogen-free*), contendo o embrião onde ocorre a replicação viral (CARVALHO, 2005). O fluxograma do processo é apresentado nas Figuras 7 e 8.

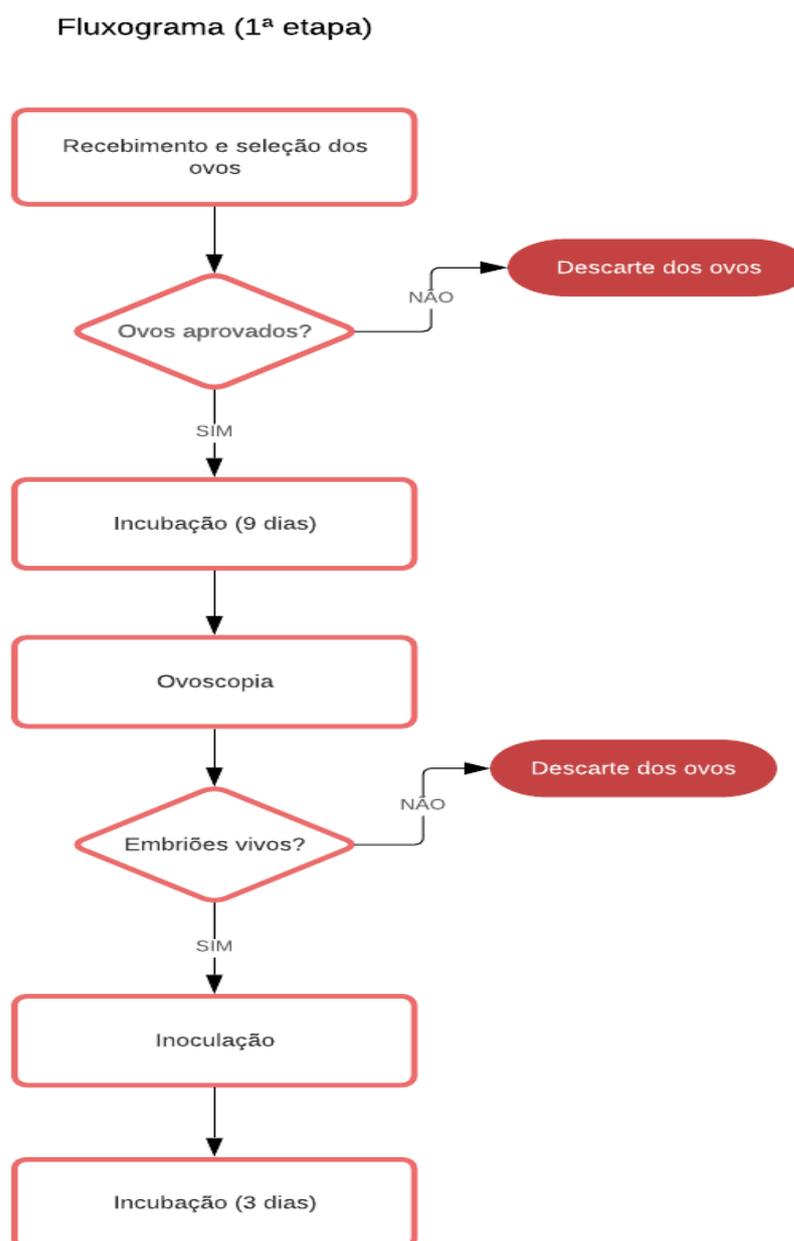


Figura 7. Fluxograma do processo de produção da vacina de febre amarela (1ª etapa).

Adaptado de: CARVALHO, 2005.

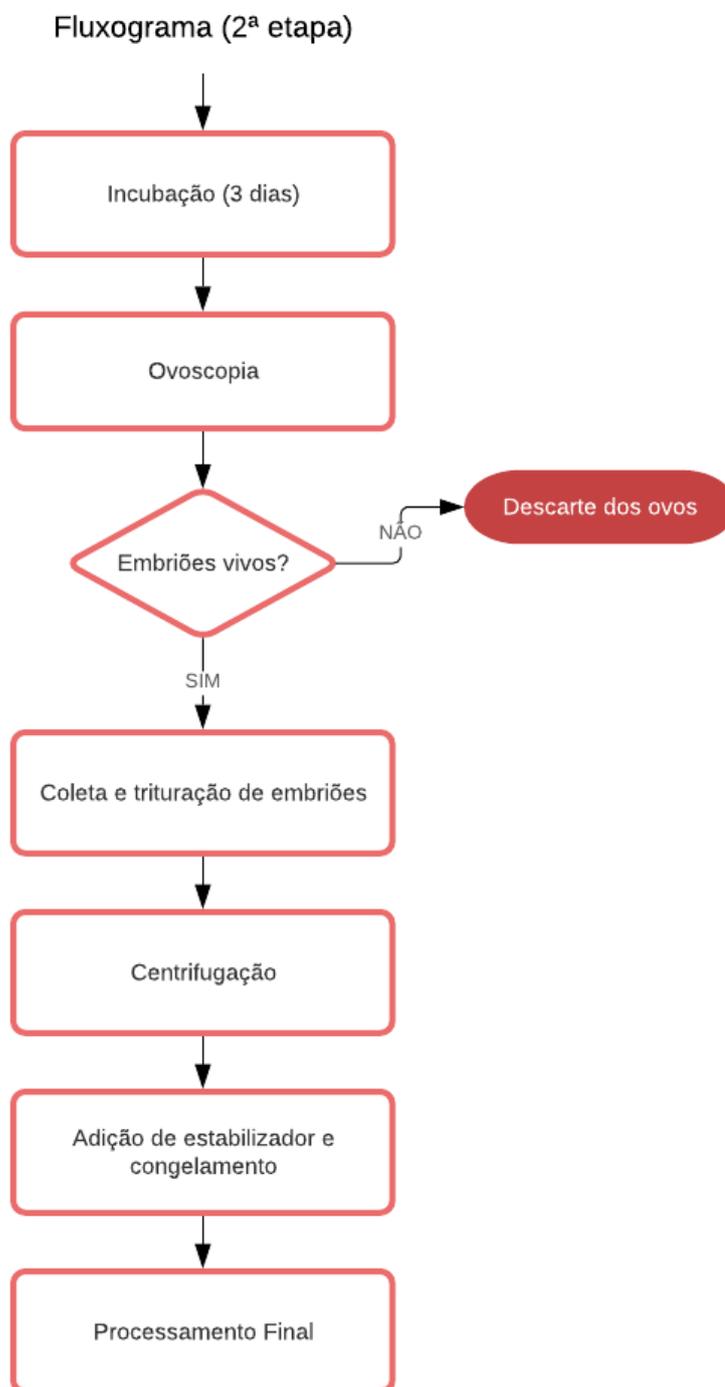


Figura 8. Fluxograma do processo de produção da vacina de febre amarela (2ª etapa).

Adaptado de: CARVALHO, 2005.

O processo é iniciado com o recebimento dos lotes de ovos SPF dos fornecedores qualificados. Esses ovos são inspecionados visualmente, sendo descartados os ovos rachados e quebrados, e em seguida são incubados em condições de temperatura e umidade controladas por 9 dias. Imediatamente antes da inoculação, é realizada a ovoscopia, por transiluminação com um ovoscópio, aparelho que incide um feixe de luz sobre o ovo e permite visualizar suas estruturas internas além da integridade e viabilidade do embrião. Os ovos não férteis e embriões mortos ou não viáveis são descartados (CARVALHO, 2005).

Os ovos aprovados na ovoscopia são colocados em suportes específicos, posicionados verticalmente com a extremidade de maior diâmetro voltada para cima. A parte central da casca é desinfetada e todo o suporte com os ovos é transferido para a área limpa. Um região de aproximadamente 2 mm é carbonizada e inocula-se uma alíquota do vírus atenuado proveniente do lote semente de trabalho (banco de trabalho). Os ovos são, então, selados e incubados por 3 dias (CARVALHO, 2005).

Após a incubação, os ovos são submetidos a uma nova ovoscopia, sendo descartados aqueles com embriões mortos. Os embriões viáveis são coletados, triturados, transferidos para frascos de centrifugação e submetidos à centrifugação. Nessa etapa, cerca de 40% do volume inicial é composta de resíduos sólidos. O sobrenadante obtido é aspirado para frascos de armazenamento com capacidade de 1L cada. De cada frasco são retiradas amostras para testes de esterilidade bacteriana e fúngica, detecção de *M. tuberculosis* e testes de potência (determinação da concentração de partículas virais na suspensão). Em seguida, os frascos são hermeticamente fechados e identificados com número de série. (CARVALHO, 2005).

Os frascos são congelados e armazenados horizontalmente a -70°C aguardando os resultados dos testes de controle microbiológico. Caso sejam aprovados, a suspensão é enviada para o processamento final, que inclui as etapas de envase, liofilização e identificação (CARVALHO, 2005).

Essa plataforma tecnológica apresenta como principal desvantagem a dificuldade de escalonamento de sua produção. As principais razões para isso são a dificuldade na obtenção dos ovos SPF, o longo tempo de processo e os seus baixos rendimentos (HOMMA et al., 2011).

### **2.3 Partículas pseudo-virais (VLPs)**

Partículas pseudo virais, ou VLPs (do inglês, *virus-like particles*) são estruturas multiproteicas tridimensionais que mimetizam a organização e estrutura de uma partícula viral nativa, exceto por não possuir o genoma do vírus (ROLDÃO et al., 2010). O fato de ter a

estrutura e composição similar à superfície externa do vírus nativo confere às VLPs a capacidade desencadearem resposta imunológica em animais, com consequente produção de anticorpos para os epítomos virais. Além disso, por não possuírem o genoma viral, as VLPs não têm a capacidade de se replicar, impossibilitando, assim, uma infecção, como acontece com os vírus nativos. Devido a essas características, as VLPs podem ser utilizadas como uma tecnologia alternativa para a produção de vacinas virais.

A ideia de utilizar proteínas virais ou partes de vírus como arcabouço para a produção de novas vacinas tomou força em meados dos anos 1970, quando foi mostrado que apenas uma proteína chave de um vírus poderia induzir a produção de anticorpos em animais (BACHRACH et al., 1975). A partir disso, em 1981, Kleid et al. conseguiram produzir, através da tecnologia do DNA recombinante, a primeira vacina contendo apenas uma proteína do vírus. A vacina, nesse caso, era indicada para prevenção da febre aftosa e era produzida a partir do polipeptídeo VP3 do vírus, expresso em *Escherichia coli* (ROLDÃO et al., 2010).

Cinco anos depois, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou uma vacina recombinante para hepatite B, sendo essa a primeira vacina aprovada utilizando a estrutura proteica do vírus – apesar de não ser considerada exatamente uma VLP por não possuir o envelope, presente no vírus nativo da hepatite B (ROLDÃO et al., 2010; NOAD; ROY, 2003). Atualmente, existem algumas vacinas baseadas na tecnologia de VLPs aprovadas, a maioria para prevenção da hepatite B, como a Recombivax<sup>®</sup> HB da Merck Sharp & Dohme, e do HPV (vírus do papiloma humano), como a Cervarix<sup>®</sup> da GlaxoSmithKline e a Gardasil<sup>®</sup> da Merck Sharp & Dohme. Além disso, segundo dados do site Clinical Trials (2020), há 21 testes clínicos ativos ou recrutando pessoas relacionados a vacinas baseadas em VLPs com diferentes alvos terapêuticos.

Além das características de não serem infecciosas e desencadearem a resposta imune, as VLPs possuem outras vantagens em sua utilização. Uma dessas vantagens está no fato de que alguns vírus têm uma maior dificuldade de replicação *in vitro*, como por exemplo o vírus da hepatite B, o parvovirus B19 e o HPV (MELLO et al., 2008). Assim, a produção das VLPs pode ser uma estratégia que garanta o material com menor dificuldade tanto para a produção de vacinas como para utilização em pesquisa científica. Essa vantagem está diretamente relacionada com outra característica interessante das VLPs, do ponto de vista tecnológico, que resulta no fato dessas partículas serem produzidas através da tecnologia de DNA recombinante em diversos sistemas de expressão, tais como leveduras, células de insetos e células de mamíferos (MOHSEN et al., 2017). Isso torna a produção dessas partículas uma tarefa mais

simples e segura. Simples no sentido de trabalhar com plataformas de expressão bem conhecidas e estabelecidas e segura no sentido de evitar a utilização de vírus nativos, que envolve maiores riscos e, no processo de produção de vacinas, precisam ser de cepas atenuadas ou então inativados no processo produtivo, adicionando mais etapas ao processo.

É importante ressaltar que a utilização de sistemas de expressão complexos (células eucariontes) se faz mandatória na produção das VLPs, uma vez que essas partículas são estruturas complexas e multiméricas que requerem certos níveis de modificações pós-traducionais nas proteínas que as compõem, além de necessitarem de proteínas especiais, as chaperonas, para a construção do capsídeo (MELLO et al., 2008).

Apesar das diversas vantagens do uso de VLPs como tecnologia alternativa na produção de vacinas, existem alguns fatores, sobretudo de natureza tecnológica, que dificultam sua utilização em larga escala. Seu uso como base para vacinas só pode ser sustentado quando comprovada a viabilidade técnico-econômica do projeto.

Em relação à plataforma de expressão, a produção de VLPs com perfil mais complexo de modificações pós-traducionais, requer o uso de células munidas de um arcabouço bioquímico capaz de realizar tais modificações e, nesse sentido, as células de mamíferos seriam a escolha prioritária. Porém, em comparação a outros sistemas de expressão como baculovírus/inseto e leveduras, o controle dos processos é mais rigoroso, as produtividades são normalmente menores e os custos no processo são mais elevados, devido à complexidade dos processos de *upstream* e *downstream* (ROLDÃO et al., 2010).

Outro desafio na produção de VLPs é a padronização na formação das estruturas proteicas. A formação de VLPs com a estrutura correta depende de diversos parâmetros de processo como pH, temperatura, força iônica, entre outros, e não é incomum a aparição de estruturas malformadas, como agregados. A padronização e otimização dos processos, principalmente para VLPs estruturalmente mais complexas, é necessária para evitar a formação dessas estruturas indesejadas.

#### **2.4 Desenvolvimento de um produto biológico e assuntos regulatórios**

O lançamento de um produto biológico no mercado é um processo longo, custoso e dividido em diversas etapas. Para ser aprovado para comercialização e uso, é necessário que o produto se prove seguro, eficaz e que cumpra com todas as suas especificações. Essa comprovação é demonstrada através de uma compilação de documentos e registros de testes (*in vitro*, em animais e em voluntários humanos) com o produto – conhecida como dossiê de

registro – que são apresentadas para as autoridades de vigilância sanitária de um determinado país no momento da solicitação de registro do produto.

No Brasil, a agência regulatória responsável pelo registro de produtos para a saúde, incluindo produtos biofarmacêuticos, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ou ANVISA, entidade vinculada ao Ministério da Saúde. As regras e determinações para o registro de produtos biológicos são descritas na Resolução da Diretoria Colegiada de número 55 (RDC 55), de dezembro de 2010.

Para a comprovação da qualidade, da eficácia e da segurança de um produto biológico a realização de testes pré-clínicos e clínicos é imprescindível e obrigatória. Testes pré-clínicos são realizados em animais e têm como objetivos principais determinar a dose inicial segura para a utilização em humanos, encontrar potenciais órgãos-alvo em que possa haver toxicidade, verificar a reversibilidade dessa toxicidade e definir parâmetros de segurança para o monitoramento nos testes clínicos (CASTANHEIRA, 2018a).

Já os testes clínicos representam a etapa de teste do produto biológico em voluntários humanos e são divididos em 4 fases:

- Fase I: é o primeiro estágio dos testes em humanos e tem como objetivo determinar os perfis farmacocinético, farmacodinâmico (quando possível) e de segurança (eventos adversos). Geralmente nessa etapa os participantes são pessoas saudáveis, entretanto para testes de medicamentos para doenças graves como alguns tipos de câncer e HIV, os participantes podem ser pacientes. O número de participantes é pequeno, normalmente envolvendo dezenas de pessoas;
- Fase II: é a etapa onde se iniciam as determinações de eficácia e segurança em humanos, selecionando a dose e o intervalo de administração e fornecendo dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do produto para subsidiar os estudos de fase III. O número de participantes é maior em relação à fase I e pode variar de dezenas a milhares de pessoas dependendo do produto;
- Fase III: são grandes estudos realizados, geralmente são estudos multicêntricos envolvendo de centenas a dezenas de milhares de pacientes, com critérios de exclusão e inclusão rigorosos (CASTANHEIRA, 2018b);
- Fase IV: são estudos de acompanhamento pós-comercialização, com o objetivo de avaliar efeitos adversos pouco frequentes, por exemplo (SEGURA, 2016).

Os aspectos regulatórios não se limitam apenas ao teste do produto em si, sendo necessário também que a(s) empresa(s) que fabrica(m) e distribue(m) o produto possuam

certificações de boas práticas de fabricação correntes (cBPF) e de boas práticas de distribuição e armazenagem correntes (cBPDA) obtidos junto à ANVISA, responsável pela fiscalização e concessão de certificados, que comprovam que o processo de produção e distribuição segue padrões de qualidade e segurança de acordo com padrões internacionais (CASTANHEIRA, 2018c).

## **Capítulo 3 – Projeção de demanda**

O presente capítulo apresenta a projeção da demanda para a vacina de febre amarela, na qual o projeto irá se basear para a escolha da escala de produção. Para tal, foi realizado um estudo do mercado atual da vacina de febre amarela, tanto nacional como internacional, identificando os produtores, os possíveis clientes, o volume de produção, o preço praticado e as projeções da evolução de demanda para o futuro.

Em geral, as metodologias de projeção de demanda podem ser divididas em métodos qualitativos e quantitativos. Os métodos qualitativos normalmente se baseiam em informações subjetivas –como opiniões e julgamentos de especialistas nos mercados– difíceis de representar numericamente. Os métodos quantitativos envolvem a análise numérica dos dados históricos do mercado (isentos de opiniões pessoais) e normalmente empregam modelos matemáticos/estatísticos para projetar a demanda futura (ALVES; OROSKI, 2019).

O mercado de produtos biológicos possui uma dinâmica muito particular e as variáveis que afetam o comportamento da demanda são, em geral, específicas para o produto biológico estudado, dificultando a aplicação de modelos econométricos mais gerais, abordagem normalmente utilizada em projeções de demanda para a indústria em geral. A definição das variáveis independentes é crucial para a confiabilidade das projeções. Nesse sentido, a proposição da demanda para vacina contra febre amarela partirá da análise de dados específicos do mercado para esta vacina.

### **3.1 Análise do mercado atual**

#### **3.1.1 Produtores e clientes**

O mercado de produtos biológicos, como já dito, possui uma série de particularidades, normalmente apresentando uma dinâmica específica para cada produto. Em relação à vacina contra febre amarela, o mercado é majoritariamente público, com a aquisição do produto sendo feita pelo governo dos países ou por entidades envolvidas com a erradicação da doença mundialmente. Nesse último caso, especificamente se encontram a Organização Mundial da

Saúde (OMS), o UNICEF<sup>8</sup> e a GAVI<sup>9</sup>, que juntas formaram uma parceria e desenvolveram a EYE (*Eliminate Yellow Fever Epidemics*) Strategy, um plano estratégico de longo prazo com o objetivo de unir globalmente países e parceiros, fazendo com que esses atuem coordenadamente de modo a eliminar o risco de novas epidemias de febre amarela ao redor do mundo (WHO, 2018b).

No que diz respeito aos produtores, atualmente há apenas seis produtores da vacina contra febre amarela no mundo inteiro, sendo quatro deles (BioManguinhos/Fiocruz, Brasil; Instituto Pasteur Dakar, Senegal; Instituto Chumakov de Poliomielite e Encefalites Virais, Rússia; e Sanofi Pasteur, França) pré-qualificados pela OMS para distribuir a vacina internacionalmente e dois (Sanofi Pasteur, Estados Unidos; e Instituto Wuhan de Produtos Biológicos, China) direcionados para o mercado interno em seus respectivos países (BARRETT, 2016). A Tabela 2 apresenta os produtores pré-qualificados pela OMS, com as características das vacinas comercializadas, o ano de aquisição da pré-qualificação e o status atual da qualificação.

Os quatro produtores pré-qualificados pela OMS ainda possuem o sistema de produção de vacina baseado na utilização de ovos SPF (*specific pathogen-free*) que são incubados para gerar embriões e então infectados com o vírus para a propagação do mesmo. Esse fato tem se apresentado como uma das principais razões para o déficit de oferta frente à necessidade mundial, uma vez que o processo produtivo atual possui uma dificuldade maior em aumentar a quantidade de doses produzidas, como já foi dito no capítulo anterior. Por conta disso, todos os quatro produtores têm realizado investimento de modo a conseguir aumentar suas capacidades produtivas e até modernizar seu processo produtivo (UNICEF, 2016). BioManguinhos/Fiocruz, por exemplo, já iniciou o desenvolvimento de uma nova vacina contra febre amarela com vírus 17DD atenuado produzido em células Vero propagadas em biorreatores (PATO et al., 2019). Isso mostra um movimento de escolhas por plataformas de produção que envolvam a utilização de biorreatores, de modo a conseguir um controle maior da escala de produção.

---

<sup>8</sup> O Fundo das Nações Unidas Para a Infância (UNICEF) é um órgão das Nações Unidas com o objetivo “de defender e proteger os direitos de crianças e adolescentes, ajudar a atender suas necessidades básicas e criar oportunidades para que alcancem seu pleno potencial” (UNICEF, 2020).

<sup>9</sup> A GAVI, *the Vaccine Alliance* é uma organização internacional criada em 2000 que tem como objetivo garantir o acesso à vacinação para crianças residentes em países pobres (GAVI, 2020).

Tabela 2. Produtores de vacinas contra febre amarela pré-qualificados pela OMS

<b>Produtor</b>	<b>Pré- Qualificação OMS</b>	<b>Formulação</b>	<b>Apresentação (doses)</b>	<b>Validade (meses)</b>	<b>Status Atual da Pré- Qualificação</b>
BioManguinhos	2001	Liofilizado	5	24	Ativo
	2007	Liofilizado	10	36	
	2001	Liofilizado	50	24	
Instituto Chumakov	2009	Liofilizado	2	24	Ativo
	2009	Liofilizado	5	24	
	2009	Liofilizado	10	24	
Instituto Pasteur Dakar	2001	Liofilizado	5	36	Ativo
	2001	Liofilizado	10	36	
	2001	Liofilizado	20	36	
Sanofi Pasteur França	1987	Liofilizado	10	36	Ativo

Adaptado de: UNICEF, 2016.

Em termos de divisão do mercado, isto é, quanto cada um dos produtores fornece para as entidades responsáveis pelo combate à doença, a Sanofi Pasteur e o Instituto Chumakov são os maiores fornecedores, sendo ao primeiro atribuído, em média, aproximadamente 45% do fornecimento e ao segundo em média 25%. BioManguinhos/Fiocruz e o Instituto Pasteur Dakar seguem com respectivamente 15% cada, em médias aproximadas. Esses valores podem ser observados na Tabela 3, que apresenta o fornecimento de doses de vacina contra febre amarela à UNICEF em 2015 e suas projeções para 2016 e 2017 (UNICEF, 2016). Contudo, considerando o mercado interno brasileiro, BioManguinhos/Fiocruz é o maior produtor mundial da vacina (FIOCRUZ, 2017).

Tabela 3. Fornecimento de doses de vacina contra febre amarela ao UNICEF em 2015 e previsão de fornecimento para 2016 e 2017.

<b>Produtor</b>	<b>Fornecimento em 2015 (doses)</b>	<b>Fornecimento em 2016 (doses)</b>	<b>Fornecimento em 2017 (doses)</b>	<b>Total (doses)</b>
BioManguinhos/FIOCRUZ	-	8.000.000	7.500.00	15.500.000
Instituto Chumakov	18.691.350	12.000.000	11.000.000	41.691.350
Instituto Pasteur Dakar	2.058.250	7.453.880	7.603.880	17.116.010
Sanofi Pasteur França	19.303.100	21.000.000	24.000.000	64.303.100
<b>TOTAL</b>	<b>40.052.700</b>	<b>48.453.880</b>	<b>50.103.880</b>	<b>138.610.460</b>

Adaptado de: UNICEF, 2016.

Em relação à entrada de concorrentes no mercado, não é esperada a entrada de novos produtores para próximos anos. O mercado de vacina contra febre amarela não é muito atrativo, uma vez que é relativamente pequeno em comparação a outras vacinas e possui uma margem de lucro baixa. Exceto para viajantes, a vacina só é comercializada em áreas endêmicas e apenas uma dose é necessária, desincentivando a entrada de novos produtores. Além disso, as estimativas de demandas são geralmente incertas e variam muito com a ocorrência de surtos da doença (WHO, 2018b).

### 3.1.2 Oferta e Demanda Mundiais

De acordo com a OMS (WHO, 2016), a capacidade de produção atual para a vacina contra febre amarela é de aproximadamente 80 milhões de doses/ano, somando-se todos os quatro produtores pré-qualificados. Entretanto, o que vem ocorrendo nos últimos anos é um fornecimento abaixo do requerido pela OMS e pelo UNICEF. Para exemplificar o fato, para o ano de 2016-2017, as previsões de demanda para a vacina contra febre amarela a serem adquiridas pela UNICEF eram de 54,5 milhões de doses/ano, sendo fornecidos 90% desse valor. As previsões da Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) para o mesmo ano eram de 15 milhões de doses para o mesmo período, de modo a atender a demanda do continente americano, com exceção do Brasil (UNICEF, 2016). Além disso, de acordo com a GAVI, de 2011 até 2015, o fornecimento de vacinas para a África foi 27% abaixo da demanda e teve um pico de crescimento em 2016 devido ao surto ocorrido em Angola (GAVI, 2017).

Para exemplificar a defasagem no fornecimento de vacinas para os órgãos mundiais responsáveis pelo controle da febre amarela é preciso entender como estão divididas as atividades de imunização desempenhadas por eles. A OMS divide as atividades de imunização em três grupos: vacinação de rotina, campanhas de vacinação preventiva e resposta a surtos

(UNICEF, 2016). Desde a criação da *YF Initiative*<sup>10</sup>, liderada pela OMS e pelo UNICEF, com apoio da GAVI, no início dos anos 2000, a vacinação de rotina contra febre amarela passou a ser incorporada em vários países endêmicos, foram realizadas campanhas de vacinação preventiva em áreas de risco de transmissão da doença, além da criação de um estoque específico para respostas aos surtos. Todas essas ações, levaram ao aumento significativo da demanda anual pré-anos 2000 de aproximadamente 5 milhões de doses para uma demanda média de aproximadamente 34 milhões de doses/ano desde 2007 (UNICEF, 2016).

O estoque de emergência global para respostas a surtos mantido pela *International Coordinating Group on vaccine provision*<sup>11</sup> (ICG) e financiado pela GAVI é atualmente de 6 milhões de doses. Durante o surto em Angola e na República Democrática do Congo, em 2016, o estoque foi repostado duas vezes para conseguir controlar a transmissão da doença, alcançando 18 milhões de doses e demonstrando, primeiramente, a crescente necessidade no fornecimento de vacinas e depois a fragilidade das populações desses países a situações de surto, devido ao baixo percentual da população vacinada (WHO, 2018a).

Segundo as previsões da OMS, o volume total de doses de vacina contra febre amarela no mercado de 2017 até 2026 está estimado em 1,487 bilhões (WHO, 2016). A demanda anual prevista pela OMS pode ser observada na Figura 9. A principal característica observada é o aumento da demanda global, ano a ano, o que exigiria um aumento no fornecimento de vacinas aos órgãos responsáveis pelo combate à febre amarela pelos fornecedores licenciados, dado o volume atualmente fornecido – visto anteriormente neste capítulo.

Em outra previsão, publicada pela GAVI em 2017, a demanda de vacina contra febre amarela apresenta a mesma tendência de crescimento, muito devido à demanda do continente africano (principal foco de distribuição da EYE). Segundo essa previsão, o volume total de vacina estimado de 2017 até 2026 é de aproximadamente 1,3 bilhões de doses, representando um valor um pouco abaixo da previsão realizada no ano anterior pela OMS. Isso se dá, pelo fato da estimativa assumir a existência de algumas restrições operacionais, o que limitaria a produção e consequentemente o fornecimento de vacinas (GAVI, 2017). Os dados dessa estimativa podem ser observados na Figura 9.

---

<sup>10</sup> Do inglês, Iniciativa Febre Amarela. É uma iniciativa organizada pela OMS e pelo UNICEF, com apoio da GAVI, com intuito de combater a febre amarela em países endêmicos, principalmente os países africanos.

<sup>11</sup> O ICG é um grupo da Organização Mundial de Saúde criado em 1997 com o objetivo de coordenar a provisão de vacinas e antibióticos aos países durante situações de surtos de doenças. A principal atuação do grupo é na garantia da manutenção dos estoques globais de vacinas para febre amarela, cólera e meningite, de forma que se possa responder rapidamente surtos dessas doenças, caso ocorram.

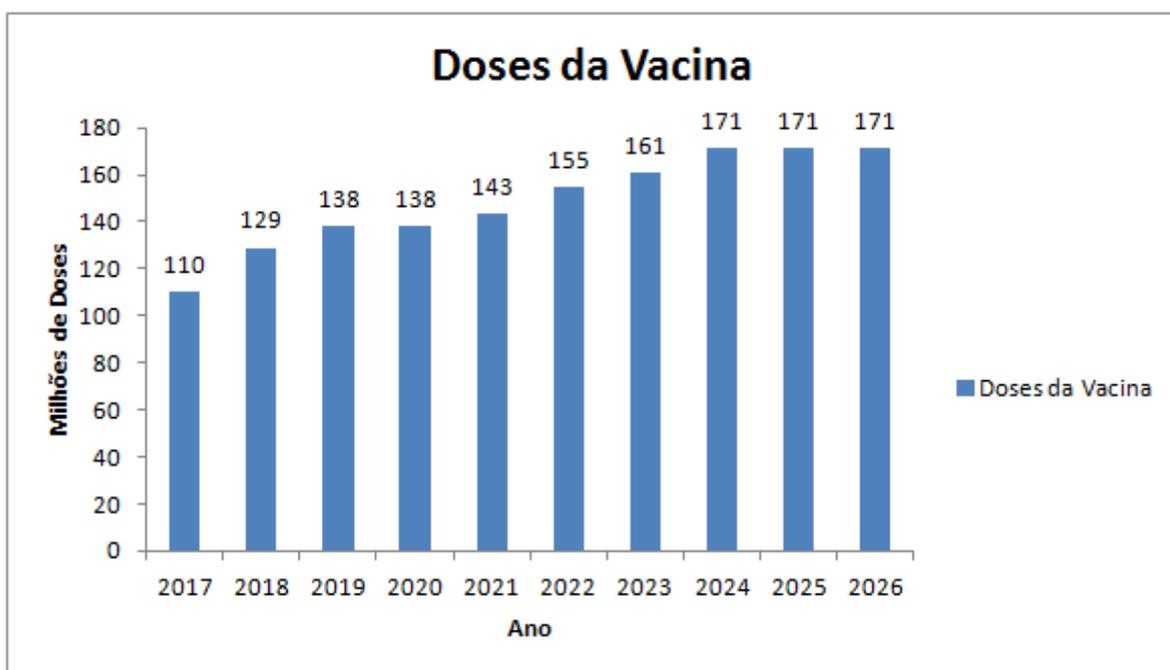


Figura 9. Previsão do número de doses de vacina contra febre amarela a ser comercializado mundialmente entre os anos de 2017 e 2026.

Adaptado de: WHO, 2016.

### 3.1.3 Mercado nacional

Para analisar o mercado brasileiro de vacina contra febre amarela deve-se olhar para os dois atores mais relevantes dentro desse contexto: o Ministério da Saúde e BioManguinhos. Existem, obviamente, outros atores que atuam no mercado brasileiro, como laboratórios da iniciativa privada e outros produtores internacionais, porém, esses têm um papel muito pequeno em comparação à participação e relevância das instituições supracitadas. Sendo assim, a análise do mercado nacional desse projeto estará pautada apenas nesses dois atores.

O Brasil é um dos principais países consumidores de vacina contra febre amarela, tendo a vacina sido incorporada ao Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde, em 1991, e sendo distribuída em grande parte do território nacional. O fato da vacina fazer parte de uma política de saúde pública do governo brasileiro faz com que esse mercado se torne especialmente grande, uma vez que o Brasil é um país com uma população e território bastante extensos em comparação a outros países endêmicos.

A Tabela 4 apresenta a quantidade de doses de vacina contra febre amarela adquiridas (com seu preço unitário) e aplicadas pelo Ministério da Saúde entre 2004 e 2018. Os dados foram fornecidos diretamente pelo Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis do Ministério da Saúde através do Sistema Eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão (e-

SIC). Os valores das doses foram disponibilizados em base real (BRL) e foram convertidos para dólar estadunidense (USD) tomando como referência a média da cotação do câmbio do dólar de venda comercial para um dado ano divulgada no site do Banco Central do Brasil.

Tabela 4. Quantidade de doses adquiridas e aplicadas pelo Ministério da Saúde do Brasil no período de 2004 a 2018, com seus respectivos anos de aquisição e preço unitário.

ANO	DOSES ADQUIRIDAS	DOSES APLICADAS	PREÇO UNITÁRIO (BRL)	MÉDIA DE CÂMBIO	PREÇO UNITÁRIO (USD)
2004	15.000.000	4.308.851	0,4860	2,926	0,166
2005	0	4.712.897	0,0000	2,436	0,000
2006	8.428.350	4.257.567	0,8383	2,176	0,385
2007	38.571.650	5.362.134	0,8744	1,948	0,449
2008	4.000.000	17.167.454	0,9023	1,837	0,491
2009	33.241.900	10.417.238	0,9555	1,993	0,479
2010	46.025.000	6.712.319	0,9985	1,759	0,568
2011	23.920.000	6.691.068	1,0600	1,674	0,633
2012	30.000.000	5.664.667	1,0600	1,954	0,542
2013	0	5.550.605	0,0000	2,16	0,000
2014	9.985.790	4.839.167	1,5000	2,354	0,637
2015	20.400.000	5.605.855	2,5830	3,338	0,774
2016	10.125.000	6.255.944	3,0300	3,483	0,870
2017	62.211.445	23.784.906	3,1457	3,192	0,985
2018	40.000.000	13.363.181	3,9800	3,654	1,089

Fonte: BRASIL, 2019a.

Através dos dados apresentados na Tabela 4, pode-se observar uma média de aquisições de 22.793.942 de doses anuais, com períodos onde a aquisição ultrapassou a média, sobretudo em 2017, ano onde o Ministério da Saúde apresentou a maior aquisição de doses dentro do período avaliado, inclusive adquirindo doses da Sanofi (4.504.700 doses) além de BioManguinhos, única fornecedora nos demais anos (BRASIL, 2019a). Os períodos onde a aquisição de doses apresentou valores excepcionalmente elevados coincidiram com a ocorrência de surtos da doença, que apresenta um padrão sazonal de aparecimento. Nos anos onde não houve aquisição ou esta esteve abaixo da média, as doses adquiridas em anos anteriores (pertencentes ao estoque) podem ter sido utilizadas para a imunização da população, o que explicaria a vacinação ter ocorrido nesses anos, mesmo sem aquisição de novas doses.

Em relação a BioManguinhos, nos últimos 15 anos (2004-2018), foram fornecidas 317,5 milhões de doses de vacina contra febre amarela ao PNI e 138,8 milhões de doses à países da América Latina e África, totalizando uma produção de 456,3 milhões de doses da vacina. Em média, a produção anual é de 30,42 milhões de doses, com 21,17 milhões destinadas ao

mercado nacional e 9,25 milhões ao mercado externo. Em porcentagem, o mercado interno absorve aproximadamente 70% de sua produção. Esses dados foram fornecidos por BioManguinhos através do e-SIC em maio de 2019.

### **3.2 Projeção de Demanda**

Para a projeção da demanda da vacina recombinante contra febre amarela definiu-se a capacidade de produção anual como sendo a soma de doses destinadas ao mercado interno e ao mercado externo produzidas por BioManguinhos. Neste modelo, adotou-se que as doses destinadas ao mercado interno correspondem a um valor 20% superior à média da quantidade de doses adquiridas pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2004 e 2018 (22.793.942 de doses anuais). Já as doses destinadas ao mercado externo correspondem a aproximadamente 30% da produção anual, assumindo a mesma distribuição de doses fornecidas aos mercados interno e externo de BioManguinhos para a vacina contra febre amarela (BIOMANGUINHOS, 2019a). A partir disso, tem-se que as doses destinadas ao mercado interno seriam 27.352.731 doses, enquanto as doses destinadas ao mercado externo equivaleriam a 11.722.599 doses, totalizando uma produção anual de 39.075.330 doses. Por conveniência, adotou-se a produção anual como sendo 40 milhões de doses.

É preciso ainda levar em consideração o regime de administração de doses a qual a vacina produzida estaria submetida. A vacina contra febre amarela atual, produzida por BioManguinhos, contendo o vírus da febre amarela atenuado só necessita uma dose para garantir a imunização por toda a vida do paciente. Até o momento, não foram aprovadas vacinas contra febre amarela baseadas em VLP no mundo e por isso o esquema de imunização associado a esse tipo de vacina não está definido.

Decidiu-se adotar um esquema de vacinação semelhante ao utilizado pelo Ministério da Saúde para a vacina contra poliomielite, constituído de duas doses, onde a primeira corresponde à vacina com vírus inativado e a segunda à vacina com vírus atenuado (BRASIL, 2015a; BRASIL, 2018d). Adaptando esse esquema, a primeira dose seria correspondente à vacina recombinante baseada nas VLPs do vírus da febre amarela e a segunda dose à vacina com vírus atenuado produzida por BioManguinhos. Este esquema permitiria combinar a elevada segurança de uma vacina baseada em VLPs (não replicativa) com a proteção duradoura conferida pela vacina atenuada (que contém vírus atenuado vivo e replicante). Dessa forma, a quantidade de doses total a ser produzida é 40 milhões de doses/ano.

## Capítulo 4 – Síntese do processo e dimensionamento dos equipamentos

Neste capítulo será proposto o processo produtivo para a produção da vacina recombinante de febre amarela, com o dimensionamento dos equipamentos envolvidos em cada etapa. Os resultados obtidos serão utilizados para a discussão da viabilidade econômica do projeto no próximo capítulo.

Diferentemente do processo de produção usual da vacina contra febre amarela, o processo produtivo proposto se assemelha mais com a produção de produtos biológicos recombinantes, como, por exemplo, anticorpos monoclonais, com a produção ocorrendo em um biorreator principal (etapas de *upstream*), o produto obtido sendo purificado e concentrado em etapas subsequentes (etapas de *downstream*) e procedendo com a formulação final e o envase e embalagem (processamento final). Cada uma dessas etapas deve ser muito bem caracterizada e validada, de modo a garantir a reprodutibilidade da produção sob Boas Práticas de Fabricação (BPF), essenciais para a produção de um produto seguro, eficaz e dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelas agências regulatórias.

O processo proposto neste capítulo tem como elemento central uma linhagem recombinante de células HEK293 que expressa de forma estável VLPs de febre amarela e seu cultivo em biorreator em modo perfusão. O processo foi baseado em estudos de expressão, produção e purificação de VLPs de febre amarela realizados no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) da COPPE/UFRJ (LIMA et al., 2019; ALVIM et al., 2019; ALVIM et al., 2020). A Figura 10 mostra um esquema do processo produtivo proposto neste trabalho.

A produção dos lotes – sejam eles clínicos, pilotos ou comerciais – é iniciada a partir de um criotubo contendo uma determinada quantidade de células produtoras de VLPs do vírus da febre amarela. Esse criotubo advém de um banco celular de trabalho (BCT), que é estabelecido a partir de um banco de células mestre (BCM). O BCM é definido como um grande número de alíquotas contendo células de composição uniforme e derivadas de um único tecido ou tipo celular conservadas em nitrogênio líquido (-196°C) (FDA, 1993). No desenvolvimento do BCM são realizados procedimentos de seleção para garantir que as células a serem armazenadas apresentem as características mais significantes para a produção e a maior estabilidade ao longo do tempo quanto possíveis, de forma a assegurar que possam ser utilizadas na produção (ETCHEVERRIGARAY, KRATJE, 2008). A partir de uma suspensão homogênea de células (uma alíquota) do BCM, após um número finito de passagens, são estabelecidas novas alíquotas

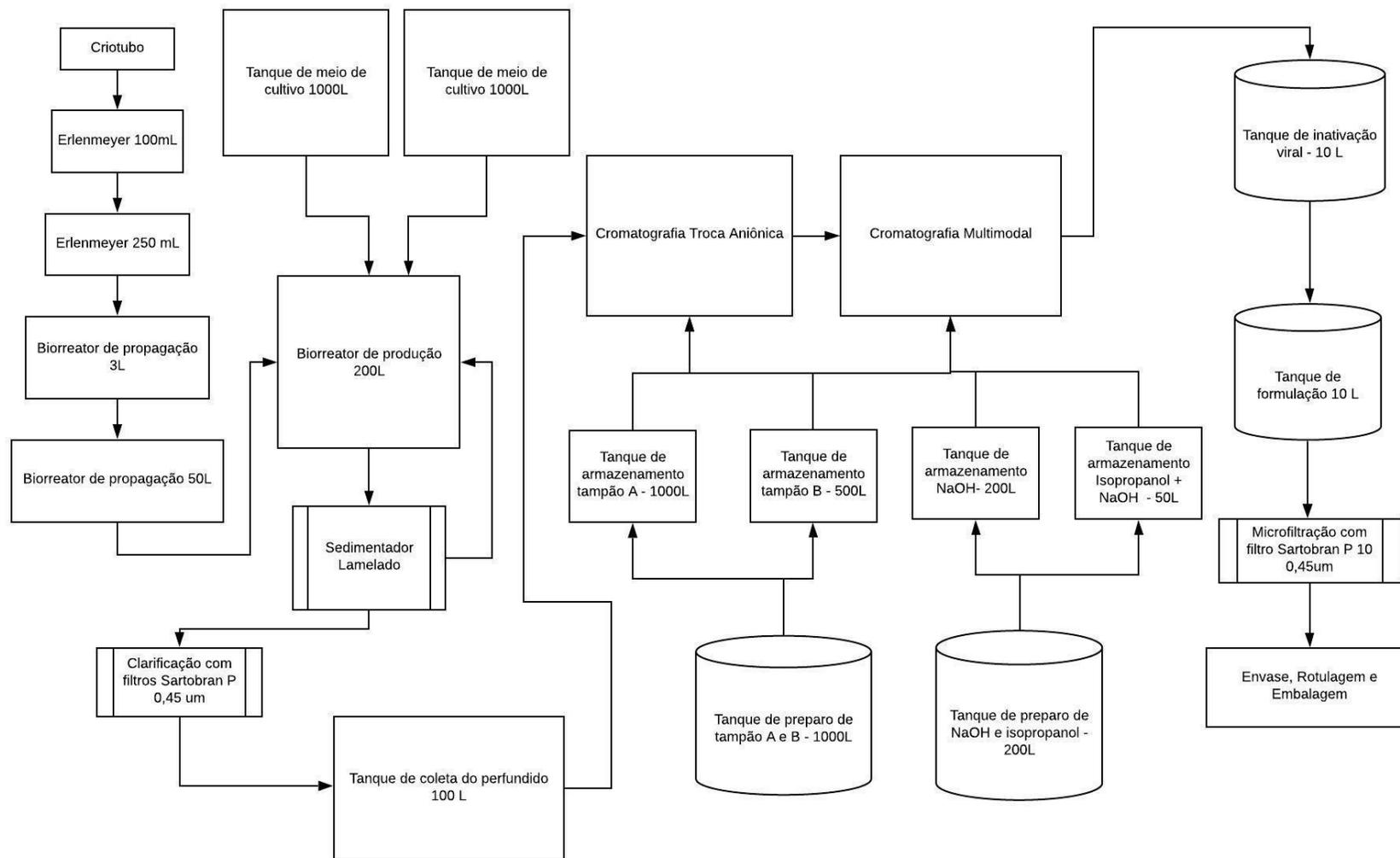


Figura 10. Fluxograma do processo produtivo para produção da vacina de VLPs contra febre amarela proposto.

Fonte: próprio autor

com volumes iguais para a armazenagem, estabelecendo assim o BCT. Cada alíquota do BCT (normalmente mantida em criotubos) dá origem a um lote do produto final.

Após o descongelamento das células contidas em um criotubo e sua sucessiva passagem para o meio de cultura adequado, ocorre a propagação dessas células, inicialmente em frascos erlenmeyer e, posteriormente, em biorreatores ditos “de propagação”. O intuito dessa propagação de células é fazer com que se alcance uma quantidade de células suficiente para a operação do biorreator de trabalho, isto é, aquele onde, de fato, ocorrerá a produção do produto final.

O modo de condução proposto para o processo foi o modo contínuo com reciclo de células, também conhecido como perfusão. Esse modo de condução tem sido amplamente estudado para diversos processos biotecnológicos na última década, devido a suas vantagens. Na perfusão, o meio de cultivo é continuamente adicionado e removido do reator, numa mesma vazão, mantendo o volume interno constante e fornecendo um aporte constante de nutrientes para as células. As células que saem do biorreator passam por um dispositivo de retenção celular e retornam ao biorreator, mantendo uma alta concentração de células no interior do biorreator durante o processo, sendo essa uma das principais vantagens. Como o meio contendo os produtos, subprodutos e metabólitos é continuamente removido, não há excesso dessas substâncias no biorreator, evitando possíveis inibições e formação de agregados de produtos (SEGURA, 2016).

O meio contendo o produto é coletado e então direcionado para as etapas de purificação do produto (*downstream*), que consiste de um processo de clarificação através do uso de microfiltração, seguido de duas etapas de cromatografia líquida e um processo de inativação viral. O produto passa ainda pelas etapas de formulação e filtração esterilizante, antes de ser direcionado para o processamento final.

O processo produtivo proposto leva ainda em consideração uma tendência do setor de produção de produtos biológicos que é a utilização de bolsas plásticas estéreis descartáveis (conhecidas como *single-use bags*) nos equipamentos. O uso de bolsas *single-use* permite uma redução significativa no tempo de preparo dos equipamentos para a produção e no uso de utilidades, uma vez que torna os procedimentos de limpeza e esterilização dos equipamentos desnecessários. Os equipamentos que utilizam bolsas *single-use* servem como suportes para as bolsas e para fazer o controle dos parâmetros de produção, não entrando em contato direto com o meio de cultivo, diminuindo assim a chance de contaminação.

A seguir, será discutida com mais detalhes cada etapa do processo produtivo, apresentando o dimensionamento de seus equipamentos.

#### **4.1. Etapas de *Upstream***

As etapas de *upstream* de um processo biotecnológico são classicamente definidas como aquelas onde há obtenção de uma quantidade suficiente de biomassa ou células através de uma cultura de células, com produção de uma biomolécula de interesse impura sob determinadas condições (pH, força iônica, estado de agregação, etc.). (ETCHEVERRIGARAY, KRATJE, 2008).

No processo de produção da vacina recombinante contra febre amarela proposto, as etapas de *upstream* são a propagação celular e a produção em um biorreator principal.

##### **4.1.1 Propagação celular**

A propagação celular é uma etapa fundamental para a produção de um produto biológico e tem por objetivo garantir que as células estejam em uma concentração e volume suficiente para que o seu crescimento na etapa subsequente seja otimizado e a produção maximizada.

Nesta etapa, um criotubo do banco celular de trabalho contendo as células produtoras é utilizado. Como as células são armazenadas em nitrogênio líquido, assim que um criotubo é removido para ser utilizado na produção, a substância crioprotetora (usualmente utiliza-se dimetilsulfóxido, também conhecido como DMSO) precisa ser eliminada ou inativada. As células então são suspensas em meio de cultura adequado e são cultivadas em frascos erlenmeyer e biorreatores com volumes crescentes até que atinjam um volume suficiente para que o biorreator de trabalho seja inoculado.

No processo proposto, as células estão presentes no criotubo em uma quantidade de  $10^7$  células. Essas são suspensas em meio de cultura fresco adequado a uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL e são cultivadas até atingirem uma concentração de  $3,5 \times 10^6$  células/mL. Quando isso acontece, essas células são levadas a um novo recipiente para ampliar seu volume, onde são inoculadas, novamente, a uma concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. Com base nesses valores, juntamente com o volume de trabalho do biorreator de produção (que terá seu cálculo explicitado mais adiante neste capítulo), é possível calcular o volume de trabalho dos recipientes de propagação. Mais detalhadamente, tendo a concentração final de células em um reator N-1 e a concentração de inoculação do próximo reator (N), assim como seu volume conhecido (iniciando o cálculo com o reator de produção), pode-se calcular a quantidade de

células presentes no reator N durante a inoculação, que será a mesma quantidade presente no final da utilização do reator anterior. Repete-se o procedimento até que se atinja um recipiente com um volume tal que permita a passagem de células do criotubo para um novo recipiente. Os resultados dessa operação são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Volumes dos recipientes utilizados na propagação do inóculo e concentrações de células inoculadas e no final de cada etapa de propagação.

Recipiente	Criotubo	Frasco <i>erlenmeyer</i>	Frasco <i>erlenmeyer</i>	Biorreitor de propagação	Biorreitor de propagação	Biorreitor de Produção
Concentração final de células (células/mL)	$1 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$
Concentração de células no inóculo (células/mL)	-	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$	$0,5 \times 10^6$
Volume de trabalho do recipiente (L)	<b>0,001</b>	<b>0,018</b>	<b>0,126</b>	<b>0,9</b>	<b>6,2</b>	<b>43,2</b>
Volume nominal do recipiente (L)	0,001	0,10	0,25	3,0	50,0	200,0

#### 4.1.2. Biorreator de produção

O pilar central do processo de produção é o biorreator de produção, podendo ser também chamado de biorreator principal. É a partir desse equipamento que são definidas características fundamentais do processo, como tempo de duração das corridas e a dimensão dos demais equipamentos, além de outros fatores operacionais como tempo de preparo e condições de cultivo das células, etc. A partir do volume de trabalho do biorreator de produção não só os reatores de propagação podem ser dimensionados como também os equipamentos subsequentes na linha de produção.

Conforme supracitado, como base para o processo proposto neste trabalho, utilizaram-se dados e informações obtidos através de experimentos realizados no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC/COPPE), localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com células animais produtoras de VLPs do vírus da febre amarela. Em especial, citam-se os trabalhos publicados por ALVIM et al. (2019), LIMA et al. (2019) e ALVIM et al. (2020). A partir desses trabalhos e dos experimentos realizados pelo LECC foram definidas condições de operação das etapas de produção e purificação das VLPs do vírus da febre amarela.

A escolha do biorreator, assim como seu modo de condução e parâmetros de operação (pH, agitação, temperatura, etc.) foi realizada a partir de ALVIM et al. (2019) e ALVIM et al. (2020), que definiram condições para produção de VLPs em biorreator do tipo tanque agitado em perfusão.

Dessa forma, foi selecionado um biorreator do tipo tanque agitado, operando em perfusão, tendo como dispositivo de retenção celular um sedimentador lamelado – um sedimentador com uma série de placas inclinadas, denominadas lamelas, dispostas lado a lado internamente, formando canais e assim aumentando a taxa de sedimentação (AZEVEDO, 2009).

Para o dimensionamento do biorreator de produção utilizaram-se as seguintes premissas:

$$\text{Volume de trabalho do biorreator} = \frac{\text{Volume coletado por corrida}}{\text{Taxa de troca de meio} \times t_{EE}} \quad (1)$$

Onde  $t_{EE}$  é o tempo em que as células se encontram em estado estacionário durante a produção, dada em dias.

$$\text{Volume coletado por corrida} = \frac{\text{Massa produzida por corrida}}{[P]} \quad (2)$$

Onde [P] é a concentração de produto no biorreator, dada em g/L.

$$\text{Massa produzida por corrida} = \frac{\text{Massa total a ser produzida}}{N^\circ \text{ de corridas possíveis}} \quad (3)$$

$$N^\circ \text{ de corridas possíveis} = \frac{DDA}{(t_c + t_p)} \quad (4)$$

Onde DDA,  $t_c$  e  $t_p$  são respectivamente o número de dias disponíveis ao ano para a operação, o tempo de operação de uma corrida e o tempo de preparo do biorreator, dados em dias.

$$\text{Massa total a ser produzida} = \frac{\text{Demanda} \times \text{Fator de segurança}}{\text{Rendimento}} \quad (5)$$

Para a utilização deste conjunto de equações é necessário definir algumas premissas e parâmetros do processo que aparecem nas equações de (1) a (5). Iniciando pela equação (5) – que define a massa total de antígeno a ser produzida por ano – a demanda é definida como o produto da demanda projetada pela massa de antígeno por dose. A demanda projetada é a mesma demanda calculada no capítulo anterior, 40 milhões de doses de vacina. Já a massa de antígeno foi definida utilizando como base os trabalhos de Pereira et. al. (2015) e Espinosa et. al. (2017).

No primeiro trabalho, camundongos foram tratados com 3 doses de uma vacina inativada contra febre amarela (com uma concentração de 2  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ) contendo alum (hidróxido de alumínio) como adjuvante. Os animais imunizados dessa forma apresentaram taxa de sobrevivência de 100% diante de uma inoculação intracerebral do vírus da febre amarela, com monitoramento durante 21 dias.

No trabalho de Espinosa et al. (2017), camundongos foram inoculados com uma vacina formulada com VLPs de zika vírus, nas concentrações de 1, 5 e 25  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , em associação com alum como adjuvante. Segundo o referido trabalho, já com a dose de 1  $\mu\text{g}$  + alum foi possível observar a ocorrência de resposta imune nos animais (na forma de títulos de anticorpos presente no sangue).

Dessa forma, fazendo uma média aritmética entre as concentrações das doses apresentadas nos dois trabalhos tem-se 1,5  $\mu\text{g}/\text{dose}$ . Entretanto, como ambos os trabalhos apresentam experimentos com camundongos, é necessário fazer um ajuste de concentração para uma vacina para seres humanos. Para realizar tal ajuste, assume-se que a dose para seres humanos em relação a camundongos é aproximadamente dez vezes maior (CASTILHO, informação pessoal) Assim, multiplicando o valor obtido por 10, obtém-se uma concentração de 15  $\mu\text{g}/\text{dose}$  para a massa de antígeno por dose.

A demanda na equação (5), portanto, é obtida multiplicando 40 milhões de doses pela massa de antígeno por dose 15  $\mu\text{g}/\text{dose}$ , obtendo-se 600 g. É feito o produto dessa demanda pelo fator de segurança, considerado para este trabalho 20%, para garantir que a produção necessária, mesmo com eventuais perdas e ineficiências não previstas ao longo do processo, resultando em uma massa de 720 g. Por fim, na equação (5) temos ainda o rendimento, que representa o rendimento total do processo considerando todas as perdas durante as etapas de purificação do processo. A Tabela 6 apresenta as etapas de purificação com seus respectivos rendimentos e o rendimento total do processo. Sendo assim, a massa total a ser produzida calculada na equação (5) é de 1234,97 g/ano.

Na equação (4), tem-se como valores para a D.D.A,  $t_c$  e  $t_p$ , respectivamente, 330, 21 e 2 dias. Com esses valores, é possível realizar 14 perfusões (corridas) ao ano. Substituindo os valores calculados em (5) e (4) na equação (3), a massa produzida por corrida precisa ser de 88,21 g.

Tabela 6. Etapas de purificação com seus rendimentos individuais e rendimento total.

Etapa de purificação	Rendimento
Clarificação	79,6%
Cromatografia Troca Aniônica	95,5%
Cromatografia Multimodal	89,7%
Inativação Viral	95,0%
Filtração esterilizante	90,0%
Total	58,3%

Fonte: LIMA et al., 2019; PATO et al., 2019; TAVARES, 2017

Através de experimentos realizados no LECC, a concentração do produto [P] no interior do biorreator durante o estado estacionário é de 0,1g/L; a taxa de troca de meio durante a perfusão é de 1,7 vvd (volume de meio por volume de reator por dia); e  $t_{EE}$  é 12 dias (ALVIM, Informação pessoal). Assim, a equação (2) permite calcular o volume coletado por corrida como 882,12 L, sendo possível calcular o volume de trabalho do biorreator de produção através da equação (1), obtendo-se o valor de 43,2 L.

É importante frisar que foi admitido para este trabalho que as células animais produzem as VLPs do vírus da febre amarela durante o tempo em estado estacionário. Dessa forma, o produto gerado antes do 9º dia de corrida é considerado um excedente da produção e não foi contabilizado nos cálculos de modo a simplificar o modelo.

Outro fator importante a ser levado em consideração é o preparo do meio de cultura. Como já dito anteriormente, em uma perfusão, o meio de cultivo é removido e alimentado do biorreator continuamente. Dessa forma, é necessário haver um cuidado prévio com os tanques de alimentação de meio de cultivo do biorreator, de forma a evitar que problemas na produção ou armazenamento do meio de cultivo possam interromper a perfusão. Assim, adotou-se um esquema com redundância de tanques, tendo 2 tanques de preparo de meio e 2 tanques de armazenamento desse meio. O volume necessário de meio é de 1055,1 L/corrída. Para chegar este valor, dividiu-se a corrida em quatro momentos, os quais possuem taxas de troca de meio diferentes e calculou-se o volume necessário para cada um desses momentos, somando-os ao final. Do dia 0 ao dia 2, não há troca de meio. Do dia 3 ao dia 5, a taxa de troca de meio é de 0,3 vvd. Do dia 6 ao dia 8, a taxa é de 0,7 vvd. E do dia 9 ao dia 21, a taxa de troca de meio é de 1,7 vvd. Multiplicando-se a taxa de troca de meio de cultivo utilizada em cada momento, o

número de dias e o volume de trabalho do biorreator, obtêm-se o valor da quantidade de meio de cultivo necessário em cada intervalo.

O dispositivo de retenção celular foi escolhido para operar com taxa de troca de meio máxima de 1,7 vvd, o que resulta em um vazão de aproximadamente 73,51 L/dia. Comercialmente, o sedimentador com a capacidade de operar a essa taxa de perfusão é o modelo CS100 da empresa Biotechnology Solution e por isso, ele foi escolhido.

Nas etapas de *upstream* do processo foram selecionados os equipamentos apresentados na Tabela 7, levando em consideração a disponibilidade comercial e características de operação dos mesmos:

Tabela 7. Equipamentos utilizados nas etapas de upstream

<b>Equipamento</b>	<b>Etapa</b>	<b>Empresa</b>	<b>Dimensão</b>	<b>Unidade</b>
Frascos Erlenmeyer	Propagação Celular	Corning	100, 250	mL
Mobius® 3 L Bioreactor	Propagação Celular	Merck	3	L
Mobius® 50 L Bioreactor	Propagação Celular	Merck	50	L
Mobius® 200 L Bioreactor	Biorreação de produção	Merck	200	L
Mobius® Mix 1000 L	Tanque de preparo de meio de cultura	Merck	1000	L
Settler CS100	Dispositivo de Retenção Celular	Biotechnology Solutions	100	L/dia

#### **4.2. Etapas de downstream**

As etapas de *downstream* do processo correspondem todas as operações aplicadas ao sobrenadante do cultivo de células após sua saída do biorreator, com o objetivo de isolar e purificar o produto alvo.

Como o processo descrito é uma perfusão, diariamente o perfundido (corrente coletada no topo do sedimentador) contendo produto é coletado. Após a coleta, esse perfundido, contendo uma concentração residual de células muito baixa, é submetido a uma etapa de clarificação antes de seguir para as etapas de captura e polimento do produto (sendo essas as

etapas de cromatografia do processo). O processo continua com a inativação viral e uma filtração esterilizante, garantindo ao produto uma alta pureza coincidente com os padrões estabelecidos pelas agências regulatórias. As etapas de processamento *downstream* descritas neste trabalho são baseadas nos trabalhos de Lima et al. (2019), Pato et al. (2019) e Tavares (2017).

#### 4.2.1. Clarificação

A clarificação é a primeira etapa à qual o perfundido do cultivo de células, contendo o produto, é submetido. Assim que deixa o biorreator, o perfundido ainda contém partículas de tamanho maior, principalmente células que, apesar do dispositivo de retenção celular, ainda acabam por escapar na corrente de saída do topo do sedimentador. O objetivo da clarificação, dessa forma, é promover a retirada dessas partículas e preparar o perfundido para as etapas de cromatografia, evitando a entrada de material particulado nas colunas cromatográficas.

No presente trabalho, optou-se pela utilização de dois filtros em série contendo uma membrana de nitrocelulose com tamanho nominal do poro de 0,45 µm, posicionados após o tanque de coleta e antes da entrada no sistema de cromatografia. O rendimento acumulado da clarificação, é de 79,6%, considerando a perda de produto no sedimentador e o rendimento da filtração (LIMA et al., 2019).

#### 4.2.2. Etapas cromatográficas

O processo cromatográfico proposto para esse trabalho consiste em um processo em duas etapas, tal como descrito por Lima et al. (2019). A primeira etapa, após a clarificação do perfundido contendo o produto, é uma cromatografia de troca aniônica, que funciona como etapa de captura do produto. A segunda etapa consiste em uma cromatografia multimodal, utilizada como etapa de polimento.

Em ambas as etapas são utilizados apenas dois tampões, o tampão A (PBS<sup>12</sup>, pH 8.0) e o tampão B (1M NaCl em PBS, pH 8.0). Esses dois tampões são utilizados em diferentes proporções nos estágios da etapa de captura (equilíbrio, lavagem e eluição) e no estágio de equilíbrio da coluna da etapa de polimento. Os dois tampões assim como as soluções de sanitização da etapa de captura (NaOH 1M) e de regeneração da etapa de polimento (NaOH 1M + isopropanol 30%) são injetados no processo a partir de um sistema cromatográfico (ÄKTA

---

<sup>12</sup> *Phosphate-Buffered Saline* (PBS): Tampão fosfato-salino preparado a partir de cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fosfato de potássio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Process System, da empresa Cityva) controlado através de um software apropriado em um computador.

Todas as soluções utilizadas são produzidas em dois tanques de mistura, um para produção dos tampões A e B e outro para produção de NaOH e isopropanol. Essas soluções são então armazenadas separadamente em quatro tanques de armazenamento acoplados ao sistema cromatográfico. Através dos cálculos realizados foram selecionados os seguintes equipamentos, apresentados abaixo na Tabela 8.

Tabela 8. Equipamentos para preparo e armazenamento de soluções utilizadas no processo cromatográfico.

<b>Equipamento</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Tanque de mistura para preparo de tampão A e B	Mobius Mix 1000L	Merck
Tanque de mistura para preparo de NaOH e isopropanol	Mobius Mix 200L	Merck
Tanque de armazenamento de tampão A	FlexSafe Palletank 1000L	Sartorius
Tanque de armazenamento de tampão B	FlexSafe Palletank 500L	Sartorius
Tanque de armazenamento de NaOH	FlexSafe Palletank 200L	Sartorius
Tanque de armazenamento de NaOH + isopropanol	FlexSafe Drum 50L	Sartorius

#### **4.2.2.1 Etapa de captura – cromatografia de troca aniônica**

O objetivo da etapa de captura neste processo é aumentar consideravelmente a concentração do produto alvo (“capturar” o produto) e promover a remoção eficiente de DNA. Na etapa de captura, o perfundido clarificado é submetido a uma cromatografia de troca aniônica, utilizando, ao invés de uma coluna tradicional com resina empacotada, um leito empacotado com uma fase estacionária consistindo de uma membrana adsortiva contendo um grupo trocador aniônico Q (amônio quaternário). A escolha desse tipo de membrana é devido a uma série de fatores, como a facilidade de escalonamento, ausência de limitações difusionais e uma boa performance em operação com altos fluxos para captura de moléculas grandes, tais como as VLPs (LIMA et al., 2019).

O dimensionamento coluna cromatográfica (ou seja, do volume de leito empacotado de membrana adsortiva) foi realizado considerando a operação diária com o material coletado do biorreator. Os cálculos foram feitos levando em consideração a capacidade dinâmica da

membrana Q determinada em Lima et al. (2019) e a massa de produto gerada por dia alimentada à coluna, com uma margem de segurança de 20%, visando compensar uma possível perda de eficiência com o tempo e/ou com o aumento de escala. A Tabela 9 apresenta os parâmetros utilizados para o dimensionamento e operação da coluna.

Tabela 9. Parâmetros utilizados para dimensionamento e operação da coluna de cromatografia de troca aniônica.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
Volume injetado	73,5	L/dia
Concentração inicial do produto	0,08	g/L
Massa de produto/dia	5,85	g
Capacidade dinâmica	2,20	mg/mL
Volume da membrana necessário	2,66	L
Volume da membrana adotado	3,19	L
Altura do leito	0,8	cm
Velocidade linear	202,7	cm/h
Vazão de operação	19,7	L/h
Tempo de operação	3,73	h
Rendimento do processo	0,96	-
Massa final de produto/dia	5,59	g
Volume eluído	4,20	L
Concentração final do produto	1,33	g/L

A cromatografia se inicia com a etapa de equilíbrio da coluna, realizada com a injeção de tampão B a 9%, de modo a adequar a coluna à condutividade do sobrenadante contendo o produto. Em seguida, a coluna é carregada com sobrenadante clarificado, fazendo com que as VLPs se liguem ao grupo Q na membrana.

São realizadas duas etapas de lavagem, uma a 9% do tampão B e outra a 12% do mesmo, de forma a garantir que todo o material que não estiver adsorvido à coluna seja removido.

Após as etapas de lavagem, a etapa de eluição das VLPs é realizada com 35% do tampão B, para que o produto seja eluído e direcionado para a próxima cromatografia. Por fim, é feita a regeneração da coluna com 100% de tampão B e esta é então sanitizada com uma solução de NaOH 1M. Os volumes das soluções utilizadas na cromatografia de troca aniônica são listados na Tabela 10.

Tabela 10. Volumes das soluções utilizadas na etapa de cromatografia de troca aniônica. Os valores estão apresentados em volumes de coluna (VC), isto é, 20 VC representa 20 vezes o volume da coluna utilizada.

Etapa	Solução	Volume (VC)
Equilíbrio	9% de tampão B	20
1ª Lavagem	9% de tampão B	25
2ª Lavagem	12% de tampão B	45
Eluição	35% de tampão B	30
Regeneração	100% de tampão B	30
Limpeza	NaOH 1M	20

#### 4.2.2.2 Etapa de polimento - cromatografia multimodal

A segunda etapa de cromatografia, chamada de etapa de polimento, consiste em um processo de cromatografia multimodal em uma coluna empacotada com a resina Cpto™ Core 700. Diferentemente da etapa de captura, a utilização da cromatografia multimodal se dá em modo *flow-through*<sup>13</sup> (FT) e permite que as VLPs possam ser excluídas pelo tamanho, sem haver adsorção à fase estacionária (resina). Além disso, essa etapa ainda consegue aumentar o *clearance* (remoção) de proteínas da célula hospedeira (HCP, do inglês *host cell proteins*), contaminantes comuns em processos de produção utilizando células animais.

Para o dimensionamento do volume de resina necessário, foram mantidos a altura do leito e a proporção entre o volume de alimentação e o volume de leito de resina utilizados por Lima et al. (2019). Foi utilizada uma margem de segurança 20% nos cálculos, considerando possíveis perdas de eficiência no processo. Com o volume de resina adotado e a velocidade linear adotada no artigo supracitado (em cm/h) é possível calcular o diâmetro necessário para a coluna. A partir dos resultados foi selecionada a coluna AxiChrom™, da Cityva, por possuir o diâmetro mais próximo ao calculado. Na Tabela 11 são apresentados os parâmetros utilizados para o dimensionamento do volume de resina utilizado e para o diâmetro da coluna.

<sup>13</sup> Em uma cromatografia operando em *flow-through*, uma proteína não interaje com a coluna, enquanto os contaminantes adsorvem à fase estacionária (YOSHIMOTO; HASEGAWA; YAMAMOTO, 2019).

Tabela 11. Parâmetros de dimensionamento do volume de resina multimodal e do diâmetro da coluna de cromatografia e seus valores calculados.

Parâmetro	Valor	Unidade
Volume injetado	4,20	L/dia
Concentração inicial do produto	1,33	g/L
Massa de produto/dia	5,59	g
Proporção volume de injeção/volume de resina	18,0	-
Volume da resina necessário	0,23	L
Volume da resina adotado	0,28	L
Altura do leito	20,0	cm
Velocidade linear	150,0	cm/h
Diâmetro da coluna	5,0	cm
Vazão de operação	2,4	L/h
Tempo de operação	1,78	h
Rendimento do processo	0,897	-
Massa final de produto/dia	5,01	g
Volume eluído	4,20	L
Concentração final do produto	1,19	g/L

Para a realização da cromatografia é utilizado o tampão B a 35% na etapa de equilíbrio e isopropanol 30% em NaOH 1M na etapa de regeneração. Os volumes utilizados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Volumes das soluções utilizadas na etapa de cromatografia multimodal.

Etapa	Solução	Volume (VC)
Equilíbrio	35% de tampão B	20
Regeneração	NaOH 1M + isopropanol 30%	40

#### 4.2.3. Inativação viral

O risco de contaminação viral é uma característica comum a todos os processos de produção de produtos biotecnológicos derivados de células animais. Essas contaminações podem ter origem na própria linhagem celular ou podem ser introduzidas ao longo do processo de produção (EMA, 1997). A necessidade de garantir a oferta de biofármacos sem que haja risco de contaminação viral fez com que etapas de inativação e remoção viral passassem a ser requeridas nos processos de purificação de biofármacos, sendo requisitos de diversas agências

regulatórias ao redor do mundo. Estas etapas têm como objetivo conferirem ao processo de purificação a capacidade de remover eventuais vírus adventícios que possam vir a contaminar o processo, sem que necessariamente tenham sido detectados.

Na indústria de biofármacos, que via de regra são proteínas monoméricas, técnicas como filtração viral, incubação em pHs extremos ou inativação por solvente/detergente, são muito usadas (CAMERON; SMITH, 2014). Contudo, no processo de produção proposto neste trabalho, o produto é uma partícula pseudo-viral, a qual seria afetada por estas técnicas. Por isso, optou-se por usar uma técnica de inativação viral baseada em  $\beta$ -propiolactona, muito usada na produção de vacinas virais inativadas (Zhang et al., 2020; FDA, 2018), nas quais as partículas virais têm que ser mantidas íntegras para estimular o sistema imune a formar os anticorpos corretos. Sendo assim, a inativação viral no presente trabalho segue o processo proposto por Pereira et. al. (2015). Após a etapa de purificação por cromatografia multimodal, o volume de produção (4,20 L) é transportado para um tanque de mistura, chamado de tanque de inativação, onde é adicionado o agente inativante  $\beta$ -propiolactona a uma diluição de 1:3000. A mistura é incubada por 24 horas a 4°C sob agitação. Após a incubação, a mistura é submetida a uma temperatura de 37°C por 2 horas para hidrolisar a  $\beta$ -propiolactona, gerando assim o ingrediente farmacêutico ativo (IFA). Considerando o volume da mistura (aproximadamente 5 L), foi selecionado o tanque de mistura Mobius Mix 10 L, da Merck, para esta etapa. Após a inativação, o IFA é então direcionado para a etapa de formulação.

### **4.3 Formulação e filtração esterilizante**

A formulação de uma vacina é um procedimento que envolve a seleção de uma combinação de diversos componentes sob diferentes condições e concentrações com o objetivo de obter-se um produto estável e com a imunogenicidade maximizada (DONALDSON et al., 2018). É nesta etapa que são adicionados os excipientes e adjuvantes responsáveis por auxiliar, respectivamente, na estabilidade do produto final e na amplificação da resposta imune provocada pela vacina.

A estabilidade e integridade das VLPs em solução é dependente de uma combinação de sais, tampões e de outros compostos utilizados. Os excipientes garantem a otimização do pH, da força iônica e de outras características físico-químicas essenciais para se obter uma vacina de VLP líquida estável (DONALDSON et al., 2018).

Vacinas compostas de componentes virais purificados, como as VLPs, podem não desencadear suficientemente a resposta imune necessária para estimular a produção de

anticorpos. Portanto, essa classe de vacinas pode requerer a adição de adjuvantes, substâncias que têm como principal objetivo melhorar a qualidade, a magnitude e a duração da resposta imune desencadeada pelas vacinas (CIMICA; GALARZA, 2017).

Os adjuvantes baseados em alumínio, comumente chamados de alum, representam uma classe de adjuvantes largamente utilizada na formulação de diversas vacinas baseadas em VLPs. Esses adjuvantes são preparados normalmente a partir de fosfato de alumínio, hidroxifosfato de alumínio e hidróxido de alumínio (CIMICA; GALARZA, 2017).

A Tabela 13 apresenta a formulação de algumas vacinas recombinantes baseadas em VLPs disponíveis comercialmente.

Tabela 13. Formulação de algumas vacinas recombinantes de VLPs comerciais.

<b>Espécie Viral</b>	<b>Nome Comercial da Vacina (Empresa)</b>	<b>Formulação</b>	<b>Referência</b>
HPV	Cervarix (GSK)	Adjuvante AS04*, cloreto de sódio e fosfato de sódio monobásico	GSK, 2015.
HPV	Gardasil (Merck)	Hidróxido de alumínio, cloreto de sódio, L-histidina, polisorbato 80 e borato de sódio	MERCK, 2015
HBV	Engerix-B (GSK)	Hidróxido de alumínio, cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico	GSK, 2019
HBV	Recombivax HB (Merck)	Hidroxifosfato de alumínio; cloreto de sódio e borato de sódio	MERCK, 2012
HBV	Fendrix (GSK)	Adjuvante AS04 e cloreto de sódio	EMA, 2017
HEV	Hecolin (Xiamen Innovax Biotech)	Hidróxido de alumínio; cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de potássio dibásico e tiomersal	WHO, 2014

Fonte: Próprio autor

\*AS04 é composto por monofosforil lipídeo A (MPL) e hidróxido de alumínio (alum)

Para a vacina proposta neste trabalho, assumiu-se uma formulação semelhante à da vacina Cervarix®, composta do adjuvante hidróxido de alumínio (0,5mg/dose) e dos excipientes cloreto de sódio (7mg/dose) e fosfato de sódio monobásico (0,624 mg/dose). Essas substâncias são misturadas ao ingrediente farmacêutico ativo (IFA) no tanque de formulação. Como o volume de trabalho não muda significativamente entre a etapa de inativação e de formulação, foi selecionado o tanque de mistura Mobius Mix 10 L, igual ao tanque da etapa anterior, para a formulação.

Após a etapa de formulação, o produto é submetido ainda a uma etapa de filtração esterilizante. Para a realização desta etapa, foi selecionado um filtro Sartobran P 10'' com tamanho nominal de poro de 0,45 µm.

#### **4.4. Processamento final**

Após a etapa de formulação e filtração esterilizante, o produto obtido – denominado de vacina a granel ou *bulk* – é direcionado para o processamento final. O processamento final engloba as etapas de envase, liofilização (no caso de produtos liofilizados), rotulagem e embalagem (BIOMANGUINHOS, 2019b).

Na etapa de envase, a vacina a granel é transferida para os recipientes primários (em contato direto com o produto), sendo normalmente utilizados frascos ampola. Esse processo é realizado por uma máquina envasadora, que promove a lavagem e esterilização dos recipientes antes de realizar a transferência da vacina. Após a transferência, os frascos recebem rolhas de borracha e são fechados totalmente (no caso de vacinas líquidas) ou parcialmente (para vacinas liofilizadas). No processo proposto neste trabalho, a vacina tem apresentação na forma líquida. Nesse caso, os frascos totalmente fechados seguem para o equipamento fixador de tampa de alumínio (BIOMANGUINHOS, 2019b).

Após o envase, a vacina segue para as etapas de rotulagem e embalagem. Os frascos contendo a vacina recebem rótulos com a identificação do produto, número de lote, data de fabricação e validade do produto, entre outras informações. Estes são então acondicionados em caixa de papelão e depois são transferidos para a área de armazenamento de produtos acabados (BIOMANGUINHOS, 2019b).

No presente trabalho, o processamento final não foi contabilizado nos cálculos de construção da planta e de aquisição de equipamentos, imaginando a possibilidade de terceirização dessa etapa em unidades multipropósitos, como por exemplo a planta de processamento final de Biomanguinhos/Fiocruz ou de outras empresas biofarmacêuticas. Assim, os custos relacionados ao produto final foram contabilizados adicionando-se um valor por dose aos custos de produção, valor este que seria pago à empresa terceirizada que faria o processamento final.

## **Capítulo 5 – Estimativa de Investimento, Custos de Produção e Viabilidade Econômica**

O presente capítulo tem por objetivo estimar o investimento total requerido para o projeto e os custos de produção, montar o fluxo de caixa do empreendimento e discutir a viabilidade de implantação de uma planta para produção da vacina recombinante contra febre amarela, produzida através do processo descrito no capítulo anterior. Para tal, necessita-se levar em consideração aspectos que vão desde o desenvolvimento da tecnologia, a realização dos testes pré-clínicos e clínicos, o processo de registro da vacina junto às agências regulatórias, a construção e operação da planta produtiva até a comercialização da vacina.

Existem diversas metodologias disponíveis para a análise de projetos, podendo ser classificadas como modelos determinísticos ou modelos probabilísticos. Modelos determinísticos são modelos matemáticos que têm como resultado um conjunto de saídas com base em um conjunto de entradas conhecidas (RENDER et al., 2017). Do ponto de vista da análise de viabilidade de projetos, um modelo determinístico gera um resultado se o projeto é viável ou não a partir de dados de entrada do projeto, como investimento total, previsão de receitas e saídas, etc. Já um modelo probabilístico é aquele que gera resultados combinatórios, construídos em um intervalo de probabilidade de cenários esperados (FELIPE; LEISMANN, 2019). Nesse tipo de modelo, a análise da viabilidade de um projeto é baseada na avaliação da variação de determinados cenários (refletida na distribuição de probabilidade de variáveis do projeto), obtendo um série de resultados sobre as chances do projeto ser ou não viável.

Neste trabalho optou-se por adotar uma metodologia determinística, baseada em alguns indicadores de viabilidade econômica do projeto como o valor presente líquido (VPL), a taxa interna de retorno (TIR), e o tempo de retorno do investimento ou *payback*, os quais serão apresentados nas seções 5.6, 5.7 e 5.8, respectivamente. Para tal, inicialmente foi realizada a estimativa do investimento total necessário e dos custos totais de produção. A partir dessas informações, foi elaborada a demonstração do resultado do exercício (DRE) para cada ano ao longo do horizonte temporal de operação da planta e montado o fluxo de caixa correspondente (simples e descontado), permitindo calcular os indicadores de viabilidade econômica.

Foram realizadas ainda análises de sensibilidade sobre as principais variáveis do projeto, a fim de discutir a viabilidade do projeto em diferentes cenários e os riscos associados ao investimento.

### **5.1. Planejamento e Horizonte Temporal do Projeto**

O processo de se lançar um produto biológico no mercado apresenta alto grau de risco, principalmente por envolver a alocação de muitos recursos financeiros ao longo de períodos de tempo extensos. A probabilidade de sucesso desse tipo de empreendimento gira normalmente entre 50-75%, podendo ser ainda menor em casos de produtos mais complexos (NICKISCH; BODE-GREUEL, 2013).

Por essa razão, é essencial que haja um planejamento muito bem definido para a execução das diversas etapas necessárias desde o desenvolvimento do produto até sua inserção no mercado.

O desenvolvimento de um imunobiológico é um processo longo, custoso e dividido em muitas etapas. O tempo médio que se leva para se desenvolver um produto biológico é entre 7 e 10 anos, incluindo todo o desenvolvimento do produto, testes pré-clínicos e clínicos e o registro do produto nas agências regulatórias (GUTIERREZ, 2015; NICKISCH; BODE-GREUEL; 2013).

Além de todo o desenvolvimento pré-clínico e clínico, é necessário também levar em consideração o tempo de construção e validação da planta produtiva e da obtenção de todas as licenças para a comercialização do produto.

Como planejamento para o lançamento da vacina recombinante contra febre amarela proposta por esse trabalho, foi imaginado um cenário onde o desenvolvimento do produto, junto com a construção da planta produtiva, durariam 9 anos. A Tabela 14 apresenta este planejamento, detalhando em quais anos cada uma das etapas seria executada. Foi considerada, ainda, a vida útil da planta produtiva como 10 anos após o início de sua operação. Por mais que a planta possa operar por mais tempo, uma vez que normalmente vacinas permanecem por um período maior no mercado, a questão dos desgastes dos equipamentos e da obsolescência do processo também são relevantes, corroborando na escolha do tempo de operação.

### **5.2 Investimento Total do Projeto**

A estimativa do investimento total necessário para a realização do projeto é dado pelo somatório dos investimentos em desenvolvimento do processo, testes pré-clínicos e clínicos, assuntos regulatórios e o investimento total requerido para a implantação da planta produtiva. Nesta seção, serão apresentadas as estimativas para cada um desses investimentos.

Tabela 14. Planejamento das etapas de desenvolvimento da vacina recombinante contra febre amarela, construção da planta produtiva e vida útil da planta.

<b>Etapa</b>	<b>Nº de anos</b>	<b>Ano correspondente no fluxo de caixa</b>
Desenvolvimento do processo e testes pré-clínicos	3	Ano 0,1 e 2
Testes Clínicos - Fase I	1	Ano 3
Testes Clínicos - Fase II	2	Ano 4 e 5
Testes Clínicos - Fase III	3	Ano 6, 7 e 8
Registro do produto e assuntos regulatórios	1	Ano 8
Construção da planta	2	Ano 7 e 8
Validação da planta	1	Ano 8
Vida útil da planta	10	Ano 9 até ano 18

### **5.2.1 Investimentos em desenvolvimento do processo, testes pré-clínicos e clínicos e assuntos regulatórios**

Na composição do investimento total necessário para se lançar um imunobiológico ao mercado, o desenvolvimento e os testes pré-clínicos e clínicos representam um dos maiores montantes. Quando o produto em questão é uma vacina, isto se torna ainda mais verdadeiro, dados os números muito elevados de voluntários que são requeridos para os testes clínicos. O número de indivíduos necessários em todas as etapas dos testes clínicos de um produto biofarmacêutico não-vacina gira em torno de 3.000 a 5.000 participantes, enquanto para vacinas o número requerido de participantes está entre 10.000 e 100.000 (WAYE; JACOBS; SCHRYVERS, 2013).

Os custos referentes ao desenvolvimento do processo, testes pré-clínicos e clínicos e aspectos regulatórios utilizados neste trabalho foram baseados nas estimativas realizadas por Tavares (2017), cujo objeto de estudo foi uma vacina inativada para febre amarela. No trabalho citado, os custos de desenvolvimento e estudos pré-clínicos foram englobados em uma categoria nomeada de estudos prévios e foram estimados a partir de trabalhos anteriores sobre o setor biofarmacêutico e informações pessoais com profissionais do setor. O mesmo é válido para os custos relacionados a assuntos regulatórios (englobando toda a atividade de submissão de dossiê de registro junto às agências regulatórias).

Para os custos dos ensaios clínicos, Tavares (2017) chega a um custo médio de U\$ 7.500 por indivíduo participante dos estudos, a partir de informações obtidas da literatura e da consulta com profissionais envolvidos com o setor biofarmacêutico.

O número de indivíduos participantes dos testes clínicos foi definido a partir de outros ensaios realizados para vacinas semelhantes à proposta neste trabalho.

Para a fase I foram considerados 60 indivíduos, equivalente aos testes clínicos de fase I da vacina inativada contra febre amarela produzida pela GE Healthcare (GE HEALTHCARE, 2016).

Para a fase II foram considerados 2.490 indivíduos, tomando como base os ensaios clínicos de fase II realizados para a vacina de DNA contra zika vírus produzida pelo NIH (National Institutes of Health, EUA) (NIH, 2017).

Por fim, para a fase III foram considerados 17.000 indivíduos, levando em consideração os ensaios clínicos de fase III da vacina contra dengue em desenvolvimento pelo Instituto Butantan e NIH (BUTANTAN, 2016).

A partir dessas informações foi possível estimar os custos de cada etapa dos testes clínicos. Esses custos, assim como os custos de desenvolvimento do processo, testes pré-clínicos e custos regulatórios são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Custos das etapas de desenvolvimento, testes pré-clínicos e clínicos e assuntos regulatórios.

<b>Etapa</b>	<b>Nº de voluntários</b>	<b>Custo por indivíduo (US\$)</b>	<b>Custo total da etapa (US\$)</b>
Desenvolvimento do processo e testes pré-clínicos	-	-	4.000.000,00
Testes Clínicos - Fase I	60	7.500,00	450.000,00
Testes Clínicos - Fase II	2490	7.500,00	18.675.000,00
Testes Clínicos - Fase III	17000	7.500,00	127.500.000,00
Registro do produto e assuntos regulatórios	-	-	5.000.000,00
<b>Total</b>			<b>155.625.000,00</b>

### 5.2.2 Investimento total para implantação da planta produtiva

O investimento total para implantação da planta produtiva pode ser calculado através do modelo apresentado na Tabela 16. Este modelo se baseia no custo de aquisição dos equipamentos principais da planta e na construção de salas limpas, em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Através desse modelo, o investimento total é dado pelo somatório do investimento fixo, dos custos de partida e validação da planta e do capital de giro necessário.

O investimento fixo é definido como o capital aplicado para a construção da planta produtiva, de modo que esta esteja pronta para a operação (FARID, 2006). O investimento fixo é constituído dos custos ISBL ou *Inside Battery Limits*, dos custos OSBL ou *Outside Battery Limits* e dos custos indiretos. O ISBL representa todos os custos diretamente relacionados ao processo produtivo, explicitados na Tabela 16. O OSBL diz respeito aos custos de unidades auxiliares ao processo produtivo, indispensáveis para seu funcionamento, como geração de utilidades (água, vapor limpo, luz elétrica, etc.), tratamento de efluentes, estoque de matérias-primas, etc. (LIMA, 2016). Já os custos indiretos são aqueles que não têm relação com o processo produtivo, como autorizações e licenças de funcionamento, custos de design e projeto de engenharia, etc. (FARID, 2006). Ainda dentro do investimento fixo, encontram-se os custos de construção de salas limpas.

Os custos de validação e partida são aqueles ligados, respectivamente, à validação do processo de produção e ao início da operação da planta produtiva. A validação do processo é uma etapa importante e exigida pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) definida através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de abril de 2010, como “evidência documentada que atesta com um alto grau de segurança que um processo específico produzirá um produto de forma consistente, que cumpra com as especificações pré-definidas e características de qualidade”.

Por fim, o capital de giro é o capital necessário para viabilizar a operacionalização do projeto. Em outras palavras, é o capital necessário para manter o funcionamento da unidade. Este capital pode ser alocado em diferentes operações como financiamento de vendas (ao se dar crédito a compradores), financiamentos de compras, manutenção de estoques, pagamento de salários e impostos, entre outras eventuais despesas adicionais que possam surgir.

Tabela 16. Estimativa do investimento total

Item				Custo
Investimento Fixo (IF)	Custos diretos (CD)	ISBL ( <i>Inside Battery Limits</i> )	Aquisição dos equipamentos (AE)	Somatório dos custos dos equipamentos principais
			Instalação dos equipamentos	45% da AE
			Controle e instrumentação	30% da AE
			Tubulações	80% da AE
			Materiais e equipamentos elétricos	20% da AE
	OSBL ( <i>Outside Battery Limits</i> )	-	45% do ISBL	
	Construção de áreas limpas - GMP	-	Somatório dos custos do m <sup>2</sup>	
Custos Indiretos (CI)	-	-	25% dos CD	
Capital de Giro (CG)	-	-	-	15% do IF
Custos de Partida (CP)	-	-	-	10% do IF
Validação	-	-	-	15% da AE

Adaptado de: SILVEIRA et al., 2005; PETERS E TIMMERHAUS, 1991; FERREIRA et al., 1995; DOUGLAS, 1998.

### 5.2.2.1 Custo de aquisição dos equipamentos principais

O custo de aquisição dos equipamentos principais do projeto foi obtido de diferentes fontes, seja por cotação direta junto aos fornecedores dos equipamentos ou com base em trabalhos anteriores. Alguns desses preços foram obtidos na forma do preço líquido no exterior, sem a inclusão de frete, taxas, imposto de importação e ICMS. Para esses casos, foi assumido que este conjunto de taxas e impostos sobre o equipamento representa 100% de seu valor. A Tabela 17 apresenta os equipamentos principais do projeto, dimensionados no capítulo 4, e seus custos de aquisição.

Tabela 17. Equipamentos principais do processo e custos de aquisição

<b>Equipamento</b>	<b>Empresa</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Custo total de aquisição (US\$)</b>	<b>Referência</b>
Fluxo Laminar Horizontal PA 120 ECO	Pachane	3	20.539,14	Tavares, 2017
Biorreator <i>single-use</i> de propagação 3L*	Merck	1	50.000,00	Cotação via fornecedor
Biorreator <i>single-use</i> de propagação 50L*	Merck	1	500.000,00	Cotação via fornecedor
Biorreator <i>single-use</i> de produção 200L*	Merck	1	600.000,00	Cotação via fornecedor
Tanque de meio de cultivo 1000L	-	4	44.000,00	Lima, 2016
Tanque de coleta do perfundido 100L - FlexSafe Palletank100L	Sartorius	1	4.212,40	Cotação via fornecedor
Sedimentador Lamelado Settler CS100M*	Biotechnology Solutions	1	30.000,00	Cotação via fornecedor
Coluna Cromatografia de Troca Aniônica - Sartobind Q Jumbo 5L	Sartorius	1	56.924,27	Cotação via fornecedor
Coluna Cromatografia Multimodal - AxiChrom	Cytiva	1	19.380,00	Cotação via fornecedor
Sistema Cromatográfico – ÄKTA Process System	Cytiva	1	300.000,00	Segura, 2016
Tanque de mistura para tampão A e B - Mobius Mix 1000L*	Merck	1	240.000,00	Cotação via fornecedor
Tanque de mistura para NaOH+isopropanol - Mobius Mix 200L*	Merck	1	80.000,00	Cotação via fornecedor
Tanque de armazenamento de tampão A - FlexSafe Palletank 1000L	Sartorius	1	7.514,00	Cotação via fornecedor
Tanque de armazenamento de tampão B - FlexSafe Palletank 500L	Sartorius	1	4.553,94	Cotação via fornecedor
Tanque de armazenamento de NaOH - FlexSafe Palletank 200L	Sartorius	1	4.212,40	Cotação via fornecedor
Tanque de armazenamento de NaOH+isopropanol - FlexSafe Drum 50L	Sartorius	1	455,39	Cotação via fornecedor
Tanque de inativação viral - Mobius Mix 10L*	Merck	1	60.000,00	Cotação via fornecedor
Tanque de formulação - Mobius Mix 10L*	Merck	1	60.000,00	Cotação via fornecedor
<b>Custo total da aquisição de equipamentos</b>			<b>2.081.791,54</b>	

\*As cotações originais não levaram em conta os custos para internalização no Brasil

### 5.2.2.2 Custos de construção de áreas limpas

Processos biotecnológicos em geral são susceptíveis a contaminações de diferentes fontes. Por conta disso, são necessários protocolos rigorosos em relação ao ambiente de produção, de modo a evitar eventuais contaminações e, portanto, que o produto seja seguro.

Dentro os diversos requisitos para a produção de um produto biológico (seja um medicamento ou uma vacina), as áreas limpas (ou salas limpas) são essenciais na manutenção de um ambiente seguro de produção e fazem parte das Boas Práticas de Fabricação exigidas pelas agências de vigilância sanitária ao redor do mundo.

Áreas limpas são ambientes onde os níveis de microorganismos e partículas presentes no ar são controlados dentro de limites específicos (ANDRADE et al., 2018). Dentro desses ambientes, há o monitoramento de sistemas de tratamento de ar, do fluxo de pessoas e materiais, das utilidades e da qualificação operacional.

Existem diferentes classificações para as áreas limpas e elas são dadas de acordo com os níveis de concentração de partículas em suspensão no ar. Para o projeto proposto neste trabalho, utilizou-se a classificação EU GMP, apresentadas na tabela 18, que classifica as áreas entre A, B, C e D, estabelecendo os limites de partículas em suspensão no ar para partículas com diâmetro maiores que  $0,5\mu\text{m}$  e maiores que  $5\mu\text{m}$  em situação de repouso e em operação.

Tabela 18. Classificação europeia de áreas limpas

<b>Classificação EU GMP</b>				
Classe	N° máximo permitido de partículas de $\text{m}^3$ igual ou maior que o tamanho especificado			
	Em repouso		Em operação	
	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 0,5\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	Não definido	

Fonte: ANVISA, 2013.

Para este projeto, estimou-se a divisão de áreas limpas com  $40\text{ m}^2$  para áreas de classe A e B,  $60\text{ m}^2$  para classe C e  $90\text{ m}^2$  para classe D (CASTILHO, informação pessoal). Os custos por  $\text{m}^2$  de cada uma dessas áreas estão apresentados na Tabela 19, juntamente com o custo total de construção de áreas limpas.

Tabela 19. Custo total de construção de áreas limpas

<b>Classificação da Área Limpas</b>	<b>Custo (US\$/<math>\text{m}^2</math>)*</b>	<b>Área (<math>\text{m}^2</math>)</b>	<b>Custo (US\$)</b>
A/B	3.300,00	40	132.000,00
C	2.000,00	60	120.000,00
D	1.000,00	90	90.000,00
<b>TOTAL</b>			<b>342.000,00</b>

\*Fonte: ALVES; OROSKI, 2019.

### 5.2.3 Cálculo do investimento total

A partir das informações apresentadas ao longo da seção 5.2, pode-se calcular o investimento total do projeto. Os resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Investimento Total do Projeto

Item				Custo (US\$)
Investimento Fixo (IF)	Custos diretos (CD)	ISBL ( <i>Inside Battery Limits</i> )	Aquisição dos equipamentos principais (AE)	2.081.791,53
			Instalação dos equipamentos	936.806,19
			Controle e instrumentação	624.537,46
			Tubulações	1.665.433,23
			Materiais e equipamentos elétricos	416.358,31
	OSBL ( <i>Outside Battery Limits</i> )	-	2.576.217,03	
	Construção de áreas limpas - GMP	-	342.000,00	
Custos Indiretos (CI)	-	-	2.160.785,94	
Capital de Giro (CG)	-	-	-	1.620.589,45
Custos de Partida (CP)	-	-	-	1.080.392,97
Validação	-	-	-	312.268,73
<b>TOTAL</b>				<b>13.817.180,86</b>

### 5.3 Custos de produção

O custo total de produção é dado pelo somatório dos custos fixos e variáveis. Os custos variáveis são aqueles que dependem diretamente da quantidade de produto produzida, como os custos de matérias-primas e utilidades. Quanto maior for a produção, maiores serão esses custos. Os custos fixos, por sua vez, são aqueles que não dependem diretamente da quantidade de produto produzida, como salário de funcionários, pagamento de impostos e seguros, manutenção, etc.

Os custos fixos podem ainda ser divididos entre custos desembolsáveis diretos e custos desembolsáveis indiretos. Os custos desembolsáveis diretos são aqueles que possuem relação direta com a produção, incluindo mão-de-obra geral, custo de manutenção de equipamentos e outras despesas gerais. Já os custos desembolsáveis indiretos não tem relação direta com a produção, podendo incluir pagamento de impostos, transportadoras, etc.

A tabela 21 apresenta a forma de estimativa de custos de produção utilizada neste trabalho, tendo como base o somatório dos custos de matérias-primas e informações sobre o ISBL e o investimento fixo.

Tabela 21. Estimativa do custo total de produção

Item		Custo	
Custos Variáveis	Matérias-primas	-	
	Utilidades	-	
Custos Fixos	Custos Desembolsáveis Diretos	Mão de Obra de Operação (MOP)	10% CTP
		Supervisão e Chefia	10% MOP
		Cargos de Laboratório	10% MOP
		Manutenção	4% ISBL
		Despesas Gerais	45% MOP
	Custos Desembolsáveis Indiretos	Despesas Gerais	65% MOP+ manutenção
		Impostos e Seguros	1,5% IF
Custo Total de Produção (CTP)		Somatório dos custos fixos e variáveis	

Adaptado de: SILVEIRA et al., 2005; PETERS E TIMMERHAUS, 1991; FERREIRA et al., 1995; DOUGLAS, 1998.

### 5.3.1 Custos das matérias-primas

O custo das matérias-primas e acessórios necessários para a produção foi calculado com base na produção anual sem considerar nenhum reajuste de preço durante toda a vigência da planta produtiva (10 anos de operação). Os preços foram obtidos por cotação direta com os fornecedores, através dos preços de venda publicados nos sites desses fornecedores ou ainda retirados de trabalhos anteriores presentes na literatura.

Assim como no caso da cotação dos equipamentos principais, alguns dos preços das matérias-primas foram obtidos como preços no exterior e sem a inclusão de frete, taxas e impostos. Para tais casos, também assumiu-se o somatório destes custos sobre o custo da matéria-prima como 100% de seu valor. A relação das matérias-primas e acessórios utilizados na produção é apresentada na Tabela 22.

Tabela 22. Custo anual das matérias-primas e acessórios utilizados na produção

<b>Matéria-prima</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Quantidade/ano</b>	<b>Unidade</b>	<b>Custo Unitário (US\$)</b>	<b>Custo Total Anual (US\$)</b>
Frasco Erlenmeyer 125mL	Corning	14	-	9,88	276,58
Frasco Erlenmeyer 250 mL	Corning	14	-	10,76	301,17
Filtros Sartobran P 0,45µm*	Sartorius	14	-	683,09	9.563,28
Filtros Sartobran P 10" 0,45µm (A = 0,6m²)*	Sartorius	14	-	728,63	10.200,83
Resina para cromatografia multimodal - Capto Core 700	Cytiva	5	L	4.318,00	43.180,00
Bolsa Descartável Biorreator de Propagação 3L	Merck	14	-	200,00	5.600,00
Bolsa Descartável Biorreator de Propagação 50L	Merck	14	-	2.000,00	56.000,00
Bolsa Descartável Biorreator de Produção 200L	Merck	14	-	4.000,00	112.000,00
Bolsa Descartável Tanque de Preparo de Tampões 1000L	Merck	14	-	2.000,00	56.000,00
Bolsa Descartável Tanque de Preparo de Tampões 200L	Merck	14	-	800,00	22.400,00
Bolsa Descartável Tanque de Inativação Viral 10L	Merck	14	-	300,00	8.400,00
Bolsa Descartável Tanque de Formulação 10L	Merck	14	-	300,00	8.400,00
Bolsa Descartável para Armazenamento de Tampão 1000L	Merck	14	-	1.000,00	28.000,00
Bolsa Descartável para Armazenamento de Tampão 500L	Merck	14	-	800,00	22.400,00
Bolsa Descartável para Armazenamento de Tampão 200L	Merck	14	-	600,00	16.800,00
Bolsa Descartável para Armazenamento de Tampão 50L	Merck	14	-	150,00	4.200,00
Meio de Cultivo HEK-GM	Xell	14.771	L	37,32	1.102.431,33
Cloreto de Sódio (NaCl) Cromatografia*	Sigma Aldrich	1.016	kg	11,33	11.509,59
Cloreto de Sódio (NaCl) Formulação*	SAFC	280	kg	9,52	2.665,15
Cloreto de Potássio (KCl)*	Sigma Aldrich	25	kg	75,90	8.998,00

Hidróxido de Sódio (NaOH)*	Sigma Aldrich	725	kg	52,97	38.389,61
Fostato de sódio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)*	Sigma Aldrich	25	kg	98,87	2.467,86
Fosfato de sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)*	Sigma Aldrich	183	kg	66,26	12.112,47
Fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )*	Sigma Aldrich	30	kg	65,23	1.987,43
Isopropanol*	Sigma Aldrich	565	L	43,43	24.520,29
Hidróxido de Alumínio (Al(OH) <sub>3</sub> ) - Alum*	Sigma Aldrich	20	kg	89,52	1.790,42
β-propiolactona	Alfa Aesar	0,3	kg	15.860,00	8.580,83
Seringas estéreis	-	40.000.000	-	0,03	2.400.000,00
<b>TOTAL</b>					<b>4.019.174,83</b>

*\*As cotações originais não levaram em conta os custos para internalização no Brasil*

### 5.3.2 Custo total de produção

A partir do custo das matérias-primas, pôde-se então calcular o custo total de produção, considerando a produção anual de 40 milhões de doses, através das relações apresentadas na Tabela 21. O custo total de produção é apresentado na Tabela 23, porém sem considerar os custos do processamento final do produto.

Tabela 23. Custo total de produção da vacina recombinante contra febre amarela sem considerar o processamento final

<b>Custos de Produção Sem Processamento Final</b>			
<b>Item</b>			<b>Custo (US\$/ano)</b>
Custos Variáveis	Matérias-primas	-	4.019.174,83
	Utilidades	-	1.008.392,64
Custos Fixos	Custos Desembolsáveis Diretos	Mão de Obra de Operação	672.261,76
		Supervisão e Chefia	67.226,18
		Cargos de Laboratório	67.226,18
		Manutenção	228.997,07
		Despesas Gerais	302.517,79
	Custos Desembolsáveis Indiretos	Despesas Gerais	585.818,24
		Impostos e Seguros	162.058,95
<b>Custo Total de Produção Sem Processamento Final</b>			<b>6.722.617,62</b>

A fim de considerar os custos do processamento final do produto nos custos de produção, foi adotado o mesmo método utilizado por Tavares (2017). O método consiste em calcular o custo de produção por dose do produto sem o processamento final – calculada dividindo o custo total de produção pelo número de doses produzidas – e somar a este o custo referente ao processamento final de cada dose do produto, obtendo-se o custo de produção por dose do produto final. Esse valor é multiplicado pelo número de doses produzidas para obter-se o custo total de produção incluindo o processamento final.

O custo total de produção considerando esse método é então aplicado em cada um dos itens da Tabela 21, obtendo-se novos valores para os custos fixos e variáveis (uma vez que estes são função do custo total de produção).

O custo total de produção por dose sem considerar o processamento final é de aproximadamente US\$ 0,17/dose. A esse valor foi acrescentado US\$ 0,18/ dose, referente ao processamento final do produto. Este valor foi estimado por Tavares (2017) através de consultas com empresas farmacêuticas e leva em consideração um processamento final com produção do diluente e liofilização do produto. Como a vacina proposta neste trabalho tem forma farmacêutica de suspensão injetável (líquida), o valor apresentado pode estar superdimensionado.

O custo final de produção por dose considerando o processamento final obtido é de aproximadamente US\$ 0,35/dose. Multiplicando este valor pelo número de doses produzidas (40 milhões/ano), obtêm-se o custo total de produção de US\$ 13.922.617,62 por ano. A Tabela 24 apresenta os custos de produção do produto considerando o processamento final, com os custos fixos e variáveis ajustados ao novo total calculado.

Tabela 24. Custo total de produção da vacina recombinante contra febre amarela considerando o processamento final

<b>Custos de Produção Com Processamento Final</b>			
<b>Item</b>			<b>Custo (US\$/ano)</b>
Custos Variáveis	Matérias-primas	-	8.124.530,61
	Utilidades	-	2.088.392,64
Custos Fixos	Custos Desembolsáveis Diretos	Mão de Obra de Operação	1.392.261,76
		Supervisão e Chefia	139.226,18
		Cargos de Laboratório	139.226,18

		Manutenção	228.997,07
		Despesas Gerais	626.517,79
	Custos Desembolsáveis Indiretos	Despesas Gerais	1.053.818,24
		Impostos e Seguros	129.647,16
<b>Custo Total de Produção</b>			<b>13.922.617,62</b>

#### 5.4 Demonstração de resultados de exercício (DRE)

A DRE é um demonstrativo contábil que gera informações para a tomada de decisão sobre um projeto ao confrontar suas receitas, os custos e despesas em um determinado período de tempo (FELIX; DIAS, 2019). Esse instrumento evidencia o desempenho do empreendimento dentro do período analisado (normalmente anual), demonstrando se houve lucro ou prejuízo. A DRE também é importante para calcular o imposto de renda (IR) aplicado ao projeto, que representa uma saída no fluxo de caixa.

A estrutura da DRE do projeto é apresentada na Tabela 25. Para o cálculo da receita líquida, foi assumido a venda de todas as doses da vacina produzidas (40 milhões/ano) com preço de venda de US\$ 3,00. O preço de venda adotado tem como base a vacina inativada contra poliomielite produzida por BioManguinhos (TAVARES, 2017). Dessa forma, a receita líquida calculada é de US\$ 120.000.00,00/ano.

As despesas operacionais foram assumidas como 20% da receita (NICKISCH; BODE-GREUEL; 2013). O lucro operacional é calculado subtraindo da receita os custos fixos e variáveis e as despesas operacionais. As despesas financeiras foram nulas, já que assumiu-se que nenhuma fonte de financiamento seria utilizada, apenas capital próprio. A depreciação anual foi calculada dividindo o investimento fixo pelo tempo assumido para operação da planta (10 anos), nesse caso representando 10% do investimento fixo. Subtraindo-se do lucro operacional a depreciação, obtêm-se o lucro antes do IR ou lucro tributável, ao qual é aplicado o imposto de renda caso seja positivo. O IR é assumido como 34% desse lucro (LIMA, 2016; TAVARES, 2017).

Tabela 25. Demonstração de resultados do exercício do projeto

<b>DRE DO PROJETO</b>	
	<b>Valor (US\$)</b>
<b>Receita Líquida</b>	120.000.000,00
(-) Custo Variável	10.212.923,25
(-) Custo Fixo (sem depreciação)	3.709.694,37
(-) Despesas Operacionais	24.000.000,00
<b>Lucro Operacional</b>	82.077.382,38
(-) Despesas Financeiras (juros)	-
(-) Depreciação	864.314,38
<b>Lucro Tributável</b>	81.213.068,00
(-) IR	27.612.443,12
<b>Lucro depois IR</b>	54.464.939,26

### 5.5 Fluxo de caixa

Dentro da metodologia de análise de viabilidade econômica adotada neste trabalho, o fluxo de caixa é a ferramenta que permite calcular os indicadores de viabilidade do projeto, ao determinar todas as entradas e saídas de capital ao longo da duração do mesmo. Especificamente, um fluxo de caixa representa o somatório entre todas as entradas e saídas de capital em um determinado período analisado. No caso deste trabalho, considerou-se um período de 18 anos, ou sejam de 10 anos após a entrada em operação da planta, dado que foram considerados 8 anos como sendo necessários para desenvolvimento do processo, estudos pré-clínicos e clínicos, construção da planta e obtenção de registro do produto.

Há dois tipos de fluxos de caixa de um projeto que podem ser calculados. O primeiro é o fluxo de caixa simples, obtido através do somatório de todas as entradas e saídas ao longo do período avaliado. A outra forma é o fluxo de caixa descontado, que considera a evolução do valor do dinheiro no tempo e traz todos os fluxos de caixa a um valor presente (ano inicial do projeto). As Tabelas 26 e 27 apresentam os fluxos de caixa do projeto, evidenciando todas as entradas e saídas de capital ao longo de toda sua duração.

Tabela 26. Fluxo de caixa durante o desenvolvimento do processo e do produto e a construção da planta

	Ano 0	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Ano 6	Ano 7	Ano 8
<b>Entradas</b>									
Receitas Operacionais Líquidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Financiamento (recebimento de empréstimos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capital de Giro Recuperado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor Residual do Projeto	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Receitas Financeiras	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Saídas</b>									
Custos Variáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Custos Fixos Desembolsáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Despesas Operacionais	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desenvolvimento do Processo e Estudos Pré-Clínicos	1,33	1,33	1,33	-	-	-	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 1	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 2	-	-	-	-	9,34	9,34	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 3	-	-	-	-	-	-	51,00	51,00	25,50
Custos Regulatórios	-	-	-	-	-	-	-	-	5,00
Validação	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31
Custo de Partida	-	-	-	-	-	-	-	-	1,08
Despesas Financeiras (juros)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Investimento Fixo (CAPEX)	-	-	-	-	-	-	-	6,48	4,32
Capital de Giro	-	-	-	-	-	-	-	-	1,62
Amortização da dívida	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Impostos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fluxo de Caixa Simples</b>	- 1,33	- 1,33	- 1,33	- 0,45	- 9,34	- 9,34	- 51,00	- 57,48	-37,83
<b>Fluxo de Caixa Descontado</b>	- 1,33	- 1,16	- 1,01	- 0,29	- 5,34	- 4,64	- 22,05	- 21,61	-12,37

Legenda: Os valores estão representados em milhões de dólares

Tabela 27. Fluxo de caixa durante a operação da planta produtiva

	Ano 9	Ano 10	Ano 11	Ano 12	Ano 13	Ano 14	Ano 15	Ano 16	Ano 17	Ano 18
<b>Entradas</b>										
Receitas Operacionais Líquidas	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00
Financiamento (recebimento de empréstimos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capital de Giro Recuperado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,62
Valor Residual do Projeto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Receitas Financeiras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Saídas</b>										
Custos Variáveis	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21	10,21
Custos Fixos Desembolsáveis	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71	3,71
Despesas Operacionais	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00	24,00
Desenvolvimento do Processo e Estudos Pré-Clínicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estudo Clínico - Fase 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Custos Regulatórios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Validação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Custo de Partida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Despesas Financeiras (juros)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Investimento Fixo (CAPEX)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capital de Giro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amortização da dívida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Impostos	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61	27,61
<b>Fluxo de Caixa Simples</b>	<b>54,46</b>	<b>56,09</b>								
<b>Fluxo de Caixa Descontado</b>	<b>15,48</b>	<b>13,46</b>	<b>11,71</b>	<b>10,18</b>	<b>8,85</b>	<b>7,70</b>	<b>6,69</b>	<b>5,82</b>	<b>5,06</b>	<b>4,53</b>

Legenda: Os valores estão representados em milhões de dólares

### 5.6 Valor presente líquido (VPL)

Como citado anteriormente, a análise de viabilidade econômica deste trabalho é baseada em indicadores de viabilidade econômica calculados a partir das estimativas realizadas no projeto. O primeiro deles a ser analisado é o valor presente líquido (VPL). De forma geral, o VPL é uma ferramenta que traz para o presente (início do projeto), ou para um ano específico, os fluxos de caixa futuros de um projeto descontados a uma taxa de juros específica – chamada de taxa mínima de atratividade (TMA) – levando em consideração o fato de que o valor do dinheiro se altera ao longo do tempo. Em outras palavras, o VPL compara o investimento realizado com o retorno obtido, trazendo-os ao momento presente.

Do ponto de vista matemático, o VPL é a soma algébrica de todos os fluxos de caixa (FC) descontados para o instante presente ( $t=0$ ), a uma taxa de juros específica  $i$ . A equação (6) apresenta a fórmula para o cálculo do VPL de um projeto.

$$VPL(i) = \sum_{j=0}^n \frac{FC_j}{(1+i)^j} \quad (6)$$

onde:

$i$  é a taxa de desconto ou taxa mínima de atratividade;

$j$  é o período temporal genérico ( $j=0$  a  $j=n$ ), percorrendo todo o fluxo de caixa;

$FC_j$  é o fluxo de caixa genérico no período  $j$

$n$  é o número de períodos do projeto.

Em relação aos resultados das análises de viabilidade utilizando o VPL, o projeto é considerado viável se apresentar VPL positivo, inviável se o VPL for negativo e indiferente se o VPL for nulo.

Quanto à TMA, esta pode ser entendida como a taxa mínima na qual um investidor considera atrativa a realização do investimento. A TMA é influenciada por diversos fatores como o risco do investimento, o custo do capital, o custo de oportunidade, as limitações de recursos a serem aplicados, a conjuntura econômica, etc. Para análises do setor biofarmacêutico em geral, a TMA aplicada varia entre aproximadamente 12-20% (LIMA, 2016; STEWARD, 2001, apud TAVARES, 2017). Para o presente trabalho, foi assumido o valor de 15% aa (ao ano).

Considerando os fluxos de caixa apresentados anteriormente e a TMA estipulada, o VPL encontrado para o projeto foi de US\$ 19.683.860,89, o que indica que o projeto seria viável economicamente.

### 5.7 Taxa interna de retorno (TIR)

Outro indicador usualmente utilizado em análises de viabilidade econômica é a taxa interna de retorno ou TIR. Matematicamente, a TIR é a taxa de desconto que torna o VPL nulo, sendo obtida através da expressão:

$$VPL(i = TIR) = \sum_{j=0}^n \frac{FC_j}{(1+i)^j} = 0 \quad (7)$$

O valor da TIR é expresso em termos percentuais e seu parâmetro de análise é baseado na comparação de seu valor com a TMA. Se a TIR de um projeto for maior que a TMA o mesmo é economicamente viável. Se for menor, o projeto é inviável e, caso seja igual, o projeto é indiferente. Dessa forma, a TIR pode ser interpretada como um valor limite da TMA e a diferença entre elas pode ser vista como uma margem de segurança para as incertezas associadas ao projeto.

Para este trabalho, a TIR calculada foi de 19,76%, portanto acima do valor de 15% da TMA. Dessa forma, o projeto pode ser considerado economicamente viável dentro das condições estudadas.

### 5.8 Tempo de retorno (*payback*)

O tempo de retorno ou *payback* é o tempo correspondente ao número de períodos necessários para retornar o valor de capital investido no projeto. Em outras palavras, é o tempo para o qual o VPL é nulo.

O *payback* é utilizado em estudos preliminares como uma avaliação rápida das alternativas de investimento, permitindo eliminar aquelas de maior risco. Um projeto com um tempo de retorno do investimento muito tardio, pode estar mais suscetível a variações não previstas, ou seja, pode apresentar um risco maior.

O *payback* é mais utilizado na avaliação de projetos com um prazo menor, pois apresenta um viés negativo para projetos de longo prazo, uma vez que nesse tipo de empreendimento o retorno do investimento normalmente acontece após vários anos, como no caso de fármacos e vacinas, que possuem longos períodos de investimento em desenvolvimento, por exemplo.

O tempo de retorno do investimento para o projeto analisado neste trabalho é entre o 14º e o 15º ano, aproximadamente 6 anos após o início da operação da planta produtiva.

### **5.10 Análises de sensibilidade**

Estudos de viabilidade econômica em geral possuem incertezas, geradas ao tentar se estimar um cenário futuro, seja ele um comportamento de preço de matérias-primas, capacidade de absorção de um produto pelo mercado, entre diversos outros fatores.

A análise de sensibilidade é uma ferramenta importante para a tomada de decisão sobre o investimento em determinado projeto, possibilitando uma análise mais completa sobre os pontos críticos e os riscos envolvidos no empreendimento. A análise é conduzida avaliando o comportamento dos indicadores de viabilidade do projeto à medida que se alteram o valor de algumas variáveis, consideradas críticas no projeto. Dessa forma, é possível observar quantitativamente o impacto de determinada variável ou premissa na viabilidade do projeto.

No caso deste trabalho foi avaliada a sensibilidade do projeto em relação às seguintes variáveis: preço unitário de venda da vacina, número de doses comercializadas, custo dos estudos clínicos, custo do investimento na construção da planta e rendimento global da purificação. As justificativas para a escolhas das referidas variáveis no estudo de sensibilidade serão abordadas a seguir.

#### **5.10.1 Preço de venda**

A vacina recombinante contra febre amarela proposta neste trabalho possui custo e complexidade de produção maior que a vacina atenuada presente atualmente no mercado. Como apresentado anteriormente no capítulo 3, o preço médio da vacina atenuada contra febre amarela é de aproximadamente US\$ 1,10, ou seja, um valor bem abaixo do preço proposto para a vacina recombinante neste trabalho, que foi de US\$ 3,00/dose, baseada no custo da vacina de poliomielite produzida por Biomanguinhos/Fiocruz.

Dessa forma, as análises de sensibilidade em relação ao preço da dose da vacina foram realizadas, considerando uma variação de US\$ 1,50 a mais e a menos em relação ao preço da dose considerado no trabalho. A Figura 11 apresenta a variação dos indicadores VPL e TIR em relação à variação do preço da dose. Pode-se observar que com o valor da dose abaixo de US\$ 2,50 o VPL passa a ser negativo e a TIR se torna menor que a TMA, tornando o projeto economicamente inviável. Isto mostra que o preço de venda da dose é uma variável sensível e crítica à viabilidade do projeto.

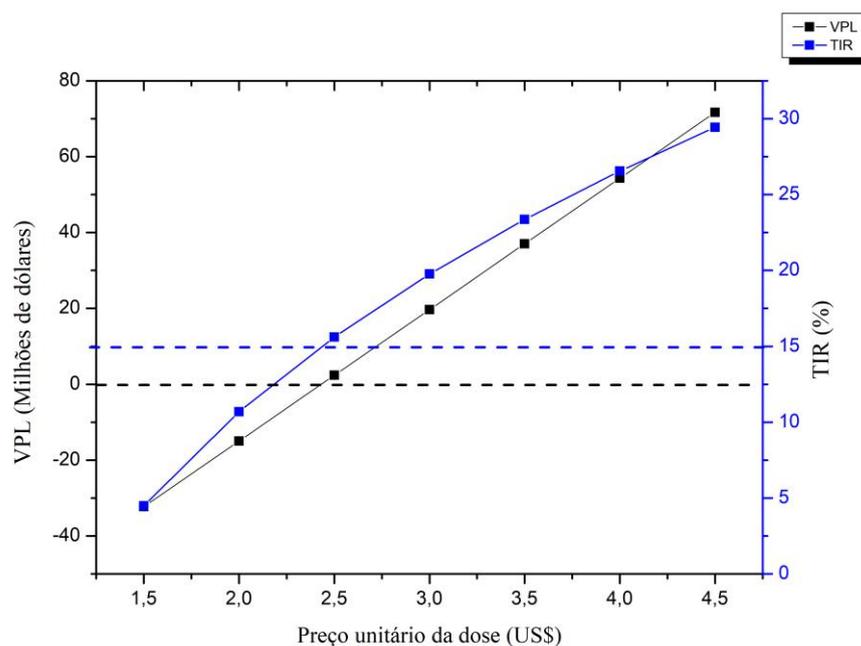


Figura 11. Análise de sensibilidade em relação ao preço unitário da dose.

### 5.10.2 Número de doses comercializadas

Foi realizada a análise de sensibilidade em relação a uma redução no número de doses comercializadas anualmente, a fim de observar qual seria o impacto de uma possível queda na demanda ou dificuldade de absorção do produto pelo mercado. A Figura 12 apresenta os resultados de VPL e TIR em relação à variação do número de doses comercializadas anualmente, lembrando-se que a capacidade produtiva adotada no trabalho foi de 40 milhões de doses por ano.

Pode-se observar que uma pequena variação no número de doses comercializadas anualmente representa um grande impacto sobre a viabilidade do projeto. Essa análise é válida quando se pensa em uma redução do número de doses comercializadas permanente, isto é, em todos os anos seria comercializado um número menor de doses do que o total produzido. O VPL torna-se negativo quando o número de doses comercializadas anualmente fica abaixo de aproximadamente 32,5 milhões de doses. Isso representa cerca de 75 milhões de doses não comercializadas ao final do tempo de operação, um número equivalente a quase dois anos de produção.

Portanto, o número de doses comercializadas anualmente é uma variável crítica à viabilidade do projeto e é importante que ela se mantenha o mais próximo possível da

capacidade produtiva máxima, ainda que exista uma margem para a redução do número de doses comercializadas.

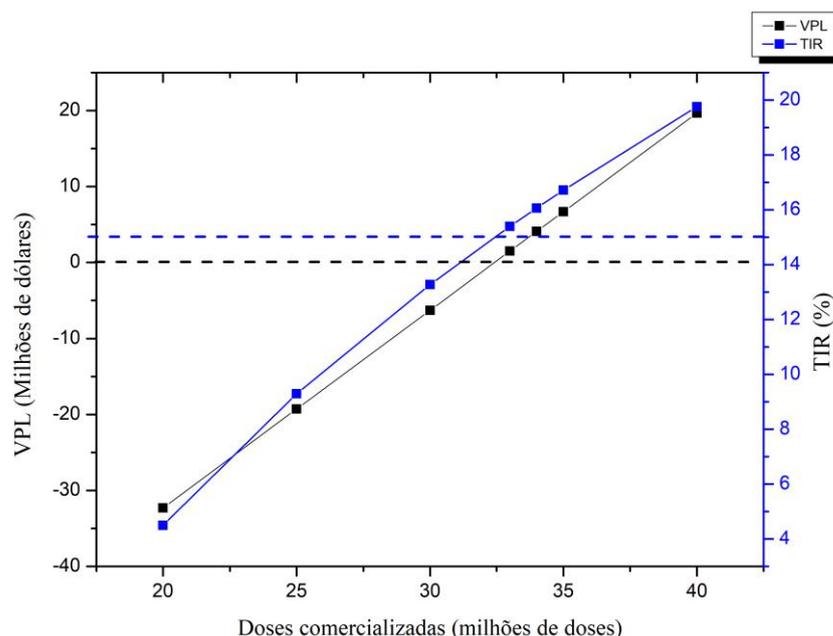


Figura 12. Análise de sensibilidade em relação ao número de doses comercializadas anualmente

### 5.10.3 Custo dos estudos clínicos

O custo dos estudos clínicos representa um dos maiores valores dentro da composição do investimento inicial no desenvolvimento de novas vacinas. Por ser uma etapa essencial e demandar uma alocação de recursos financeiros alta é importante entender o seu impacto na viabilidade do projeto. Assim, foi realizada a análise de sensibilidade em relação à variação no custo dos estudos clínicos.

A Figura 13 apresenta o comportamento do VPL e da TIR com a variação no custo dos estudos clínicos, tanto para cenários onde os estudos clínicos são mais baratos (variações negativas) quanto para cenários onde estes são mais caros (variações positivas).

É possível observar que, assim como o esperado, para os cenários onde os estudos clínicos são mais baratos os indicadores de viabilidade apresentam valores mais altos. Já no caso onde os estudos clínicos apresentam custo maior que o caso base, os valores dos indicadores só passam a apontar um cenário onde o projeto é economicamente inviável a partir de uma variação de aproximadamente +32%, o que corresponde a um aumento de cerca de US\$ 47 milhões no investimento, em relação ao valor de US\$ 155,6 milhões considerado como caso base.

Dessa forma, o custo dos ensaios clínicos pode ser considerado uma variável crítica do projeto, podendo impactar diretamente em sua viabilidade.

Diversos fatores podem impactar no custo dos ensaios clínicos, tais como os custos de insumos e equipamentos clínicos, extensão do tempo de realização dos estudos, aumento dos requisitos regulatórios para aprovação do produto biológico, complexidade em relação ao monitoramento dos pacientes, da coleta e tratamento dos dados, custos envolvidos com a contratação de mão-de-obra técnica para realização dos testes, recrutamento de pacientes e locação de locais próprios para realização dos testes (RATHORE, 2019).

É importante ressaltar que algumas estratégias podem ser tomadas para minimizar o impacto de algumas dessas variáveis como realizar os testes clínicos em países onde o custo da mão-de-obra e do recrutamento de pacientes seja menor, buscar parcerias com institutos de pesquisa, universidades e órgãos governamentais para diminuição de custos, entre outros. O uso de sistemas que facilitem a coleta e análise dos dados também pode propiciar uma redução nos custos gerais dos ensaios clínicos. Ainda assim, é difícil precisar o quanto cada uma dessas estratégias pode de fato tornar a realização dos testes clínicos mais barata.

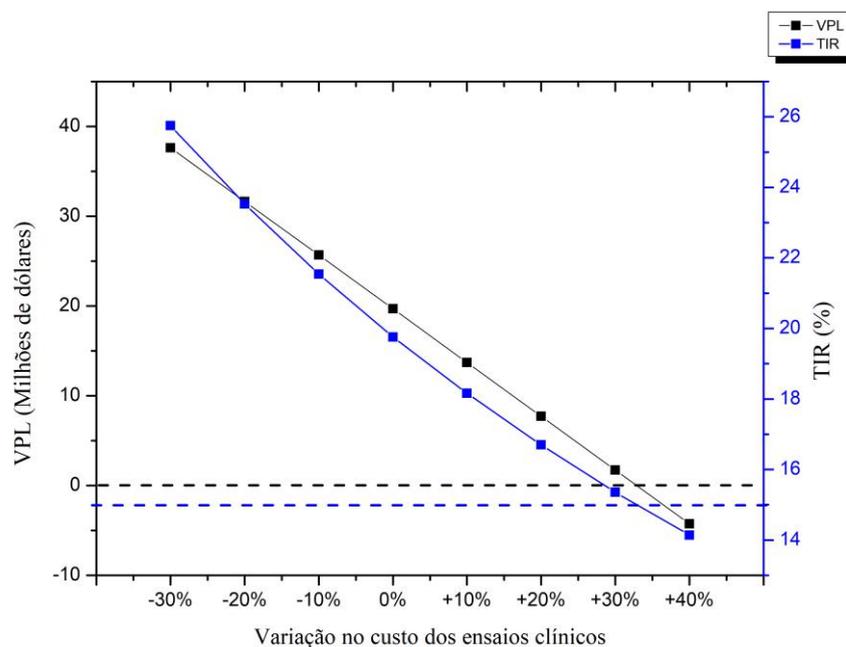


Figura 13. Análise de sensibilidade em relação ao custo dos ensaios clínicos

#### 5.10.4 Valor do investimento fixo de construção da planta

Processos de produção de vacinas, em geral, envolvem equipamentos com custo elevado e por esta razão foram realizadas análises de sensibilidade em relação ao valor do investimento fixo de construção da planta produtiva.

É possível observar na Figura 14 que há pouco impacto do valor do investimento fixo de construção da planta na viabilidade do processo, uma vez que mesmo ao dobrar seu valor (variação de +100%) o valor de VPL continua positivo e a TIR maior que a TMA.

A baixa sensibilidade dessa variável é explicada pelo fato do valor do investimento para construção da planta ser pequeno em relação ao custo total do investimento fixo (aproximadamente 6,5%). Isso ocorre pois os maiores custos envolvidos são com a realização dos ensaios clínicos, que são uma ordem de grandeza acima do investimento para construção da planta. Assim, as mudanças dessa variável, nos cenários projetados, não impactam significativamente na viabilidade do projeto.

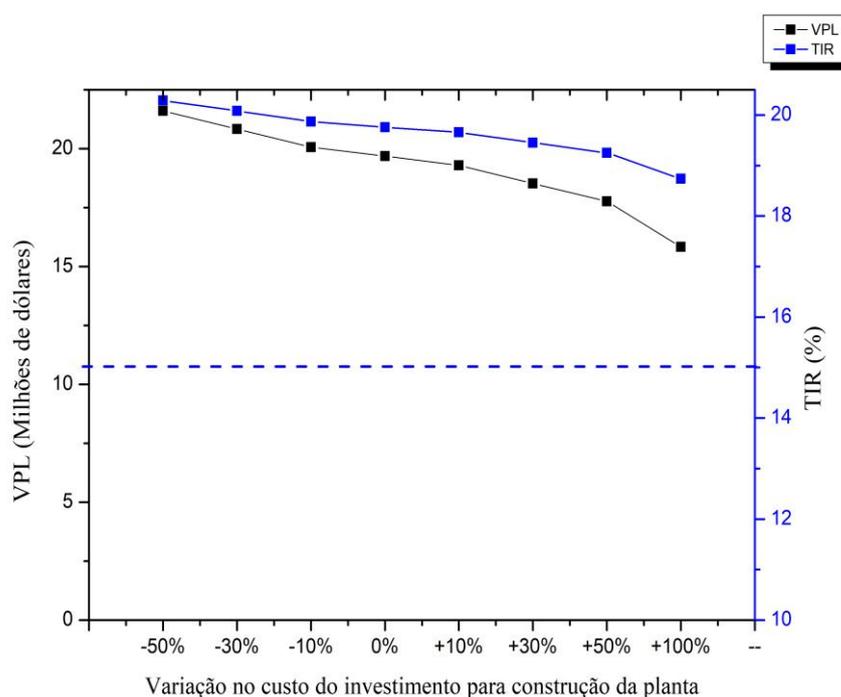


Figura 14. Análise de sensibilidade em relação a variação no valor do investimento para construção da planta

### 5.10.5 Rendimento dos processos de purificação

Por fim, foram realizadas análises de sensibilidade em relação ao rendimento global do processo de purificação. Os resultados são apresentados na Figura 15 e pode-se observar que não há muito impacto na sua variação, uma vez que, para a faixa de variação analisada, é possível operar com os mesmos equipamentos da planta, alterando apenas a quantidade de matérias-primas utilizadas na produção.

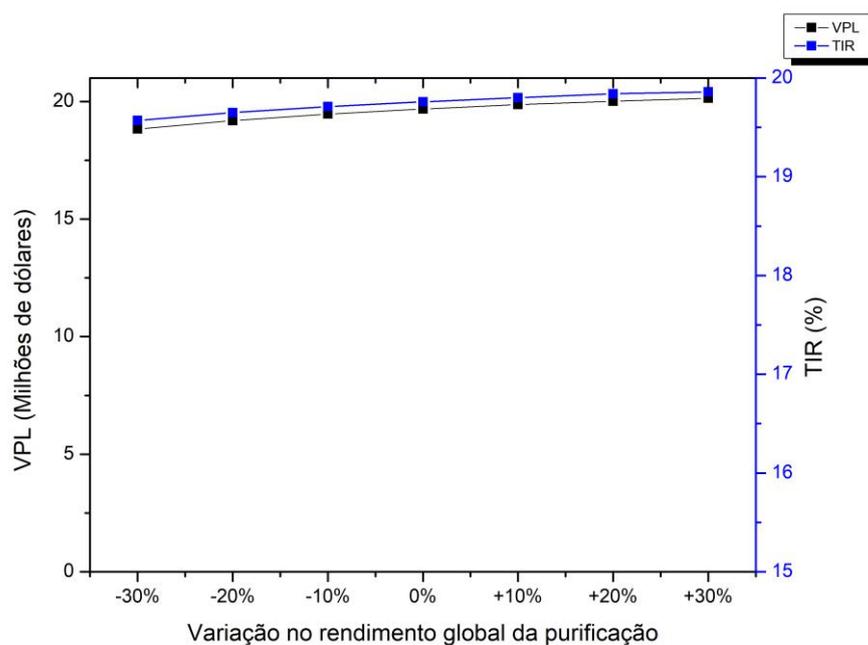


Figura 15. Análise de sensibilidade em relação a variação no rendimento global dos processos de purificação

## Capítulo 6 – Conclusões

A vacina atualmente disponível contra febre amarela, produzida com o vírus atenuado em ovos embrionados de galinha, é a principal forma de prevenção contra a doença. É uma vacina eficaz e relativamente barata, porém apresenta alguns pontos negativos, como: (i) a ocorrência de efeitos adversos que, embora raros, podem levar à morte; (ii) restrição de grupos que podem recebê-la (idosos acima dos 60 anos, gestantes, imunodeficientes, bebês abaixo dos 9 meses de idade, entre outros grupos não podem receber a vacina); (iii) a dificuldade de aumento da escala de produção em situações de surto para atender a demandas aumentadas, devido a um fator inerente ao processo, que é a limitação de obtenção dos ovos SPF. Neste contexto, torna-se recomendável o desenvolvimento de uma nova vacina e uma nova tecnologia de produção para contornar os pontos negativos apresentados.

Uma das alternativas para o desenvolvimento de uma nova vacina é a utilização de partículas pseudo-virais (VLPs), que são estruturas tridimensionais compostas por proteínas recombinantes, mimetizando a estrutura do vírus, mas sem conter o seu genoma. Por ser não replicativa, não apresenta nenhum risco de infecção provocada pelo vírus vacinal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de investimento na produção de uma nova vacina contra febre amarela utilizando VLPs como base e não mais o vírus atenuado.

Foi realizada então uma análise do mercado da vacina de modo a projetar uma demanda e, assim, definir a escala de produção. A partir dos dados fornecidos por BioManguinhos e pelo Ministério da Saúde, a demanda projetada foi de 40 milhões de doses anuais, considerando os mercados interno e externo. Esta demanda considerou um cenário em que a nova vacina recombinante, baseada em VLPs, seria usada para uma primeira imunização, podendo ser seguida por um *boost* (reforço) com a atual vacina atenuada para conferir proteção pela vida toda.

A síntese do processo produtivo foi feita com base nos trabalhos experimentais desenvolvidos no LECC/COPPE/UFRJ. O elemento principal do processo é uma linhagem recombinante de células HEK293 que expressa as VLPs de febre amarela de forma estável e seu cultivo em um biorreator de tanque agitado em modo perfusão. As VLPs produzidas são purificadas e concentradas nas etapas de *downstream* e então é realizada a formulação do produto final e seu processamento final. A dimensão dos equipamentos que compõem o processo e a quantidade de matérias-primas e insumos necessárias foram calculadas com base na demanda projetada, ou seja, considerando que a planta produzirá 40 milhões de doses da

vacina por ano. Com base no dimensionamento dos equipamentos, foram propostos modelos específicos de equipamentos de fornecedores usuais na indústria biofarmacêutica.

Para estimar o investimento requerido e os custos de produção, foi inicialmente realizada a cotação dos equipamentos e matérias-primas através de trabalhos científicos ou diretamente com as empresas fornecedoras. Adotando o método baseado no custo dos equipamentos principais, o custo de investimento fixo para construção da planta produtiva foi estimado em US\$ 13,8 milhões. Os custos de ensaios clínicos foi estimado com base na literatura em US\$ 155,6 milhões. Já os custos de produção foram calculados em US\$ 13,9 milhões.

A partir disso, foi elaborada a demonstração do resultado do exercício (DRE) para cada ano ao longo do horizonte temporal de 18 anos, sendo 8 anos iniciais para desenvolvimento tecnológico e desenvolvimento clínico do produto, construção da planta e obtenção do registro, seguindo-se 10 anos de operação comercial da planta. O fluxo de caixa correspondente (simples e descontado) foi então montado, permitindo calcular os indicadores de viabilidade econômica, VPL, TIR e *payback*. Utilizando uma taxa mínima de atratividade de 15%, os valores dos indicadores calculados (VPL = US\$ 19,68 milhões; TIR = 19,76% e *payback* entre o 14º e o 15º ano (ou cerca de 6 anos após início da operação comercial da planta) indicam o projeto como economicamente viável.

As análises de sensibilidade foram realizadas selecionando como variáveis críticas o preço de venda unitário da dose, o número de doses comercializadas, o custo dos ensaios clínicos, valor do investimento fixo para construção da planta e rendimento global das etapas de purificação.

As análises demonstraram a existência de algumas variáveis críticas ao projeto, cujas variações poderiam tornar o projeto inviável. Inicialmente, o preço de venda mostra-se como uma variável bastante sensível, dado que uma redução de US\$ 3,00 para um valor abaixo de US\$ 2,50 torna o projeto inviável economicamente. Essa pouca flexibilidade em relação ao preço é um ponto importante, uma vez que a vacina atenuada atualmente disponível apresenta um preço bem inferior (aproximadamente US\$ 1,00). Como as regiões de maior incidência da febre amarela são países com problemas sócio-econômicos mais agravados, como a África, a compra da vacina recombinante proposta só seria possível através do apoio de instituições como a Organização das Nações Unidas (ONU), a Fundação Bill e Mellissa Gates e a GAVI, que se comprometem a disponibilizar a vacina para as regiões necessitadas. A redução do preço de venda dependeria de uma redução nos custos de investimento e de produção do projeto como um todo.

Em relação à sensibilidade ao número de doses comercializadas, ressalta-se que o projeto passa a ser economicamente inviável quando há redução de aproximadamente 20% nas vendas anuais ao longo de todo o projeto, ou seja, quando só se conseguem comercializar 32 milhões de doses por ano, tendo-se construído uma planta para produzir 40 milhões de doses por ano. Isso demonstra a importância de conhecer o mercado, de forma que a demanda projetada seja a mais próxima possível da realidade, evitando que se produza um excedente. Dentro das projeções apresentadas neste trabalho para o aumento da demanda da vacina nas próximas décadas, pode-se esperar que a totalidade de doses produzidas consiga ser absorvida pelo mercado, mas existem vários fatores que influenciam nessa dinâmica, como balanças comerciais dos países produtores e compradores da vacina, ocorrência de surtos com mais frequência e em áreas até então não endêmicas, entre diversos outros fatores.

Por fim, o custo dos ensaios clínicos também apresentou-se como uma variável bastante sensível do projeto. Esse fato era esperado, uma vez que representa o maior valor que compõe o investimento inicial, tendo um importante impacto sobre a viabilidade do projeto. Existe uma margem que suporta um aumento no custo dos ensaios clínicos e que ainda mantém o projeto viável (+32%). Entretanto, acima desse valor o projeto passa a ser inviável. Os custos elevados dos ensaios clínicos ainda são um grande gargalo para o lançamento no mercado de novos produtos biológicos como as vacinas, e é ideal haja uma busca para tentar reduzi-los, porém sem comprometer uma rigorosa avaliação de segurança e eficácia do produto, de forma que haja uma redução geral no custo do investimento total, o que conseqüentemente pode ser convertido em um custo menor de venda dos produtos, melhorando o acesso da população.

Deve-se ressaltar, contudo, que os dados adotados como premissas para o presente trabalho foram de certa forma conservadores, uma vez que o isolamento/seleção de um clone produtor e o desenvolvimento do processo produtivo ainda se encontram em andamento no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC) da COPPE/UFRJ, havendo potencial de melhoria do desempenho do processo.

## Referências Bibliográficas

ALVES, F. C.; OROSKI; F. A. **Projeção de Demanda**. Aula da disciplina de Projetos e empreendimentos no setor biofarmacêutico. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2019.

ALVIM, R.G.F.; ITABAIANA, I.; CASTILHO, L. R. **Zika virus-like particles (VLPs): Stable cell lines and continuous perfusion processes as a new potential vaccine manufacturing platform**. *Vaccine*, v.37, n.47, 2019, p. 6970-6977.

ANDRADE, L.O. et al. **Matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry for identification of bacteria isolated from pharmaceutical clean rooms**. *Interventional Medicine & Applied Science*, v.10, n.1, p. 45–53, 2018.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica**. Brasília, DF, 2013.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html) Acesso em: 15 out. 2020.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0055\\_16\\_12\\_2010.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0055_16_12_2010.html) Acesso em: 15 out. 2020.

AZEVEDO, C. G. **Simulação da operação de sedimentadores contínuos**. Orientador: João Jorge Ribeiro Damasceno. 2009. 199 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2009.

BACHRACH, H.L. et al., 1975. **Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus**. *Journal of Immunology*, v.115: 1636--1641.

BARRETT, A. D. **Yellow Fever in Angola and Beyond--The Problem of Vaccine Supply and Demand**. *The New England Journal of Medicine*, v.375, n.4, p. 301–303. 2016.

BARRETT, A. D.T.; TEUWEN, D. E. **Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?** *Current Opinion in Immunology*, v.21, p.308–313. 2009.

BECK, A. S. **Population Structure of Yellow Fever Virus: Influence of Viral Diversity on Vaccine Attenuation.** Galveston, 2015. 268f. Tese (Doutorado em Filosofia) Universidade do Texas, 2015.

BECK, A. S.; BARRETT, A. D.T. **Current status and future perspectives of yellow fever vaccines.** *Expert Review of Vaccines*, v.14, n.11, p.1479-1492. 2015.

BIOMANGUINHOS. **Vacina febre amarela (atenuada): bula para o profissional de saúde.** 2012 Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=14091032016&pIdAnexo=3189204](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=14091032016&pIdAnexo=3189204). Acesso em: 17 de julho de 2019.

BIOMANGUINHOS. **Número de doses da vacina de febre amarela produzidas e comercializadas por Biomanguinhos entre 2004 e 2018.** Solicitação de acesso à informação através do sistema e-SIC. 21 mai. 2019a.

BIOMANGUINHOS. **Produção de vacinas - entenda o "processamento final".** Brasil, 2019b. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1665-producao-de-vacinas-entenda-o-processamento-final> Acesso em: 5 set. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela,** 2004. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_epid\\_febre\\_amarela.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf). Acesso em: 22 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de Erradicação da Poliomielite: Estratégia no Brasil. Brasília, DF, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunizações (PNI).** 2015b. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/entenda-o-sus/50027-programa-nacional-de-imunizacoes-pni>. Acesso em: 15 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre Amarela: Guia para Profissionais de Saúde.** 2017. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/febre\\_amarela\\_guia\\_profissionais\\_saude.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_saude.pdf) Acesso em: 23 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela: sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** 2018a. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vacina de febre amarela será ampliada para todo o Brasil.** 2018b. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42849-vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-brasil>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis **Plano estratégico de vacinação contra febre amarela.** Brasília, DF, 2018c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Informe Técnico Campanha Nacional De Vacinação Contra A Poliomielite E Contra O Sarampo.** Brasília, DF, 2018d.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doses adquiridas e administradas da vacina de febre amarela entre 2004 e 2019.** 2019a. Solicitação de acesso à informação através do sistema e-SIC. 15 mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra febre amarela e gripe.** 2019b. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/ultimas-noticias/3089-em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contrafebre-amarela-e-gripe#:~:text=Atualmente%2C%20fazem%20parte%20do%20grupo,privadas%3B%20povos%20ind%C3%ADgenas%3B%20pessoas%20com>> Acesso em: 25 nov. 2020

BUTANTAN Institute. **Phase III Trial to Evaluate Efficacy and Safety of a Tetravalent Dengue Vaccine.** 2016. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02406729?term=phase+III&cond=Dengue&draw=2&rank=1>> Acesso em: 5 Out. 2020.

CAMACHO, L.A.B. et al. **Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17 DD yellow fever vaccines: a randomized trial.** Revista de Saúde Pública, v.38, n.5, p.671-678. 2004.

CAMERON, R.; SMITH, K. **Virus clearance methods applied in bioprocessing operations: an overview of selected inactivation and removal methods.** Pharmaceutical Bioprocessing, v.2, n.1, p. 75-83, 2014.

CARVALHO, R. **Controle estatístico do processo de produção da suspensão viral da vacina contra febre amarela fabricada por Biomanguinhos/Fiocruz**. 100 folhas. Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz, Instituto De Tecnologia Em Imunobiológicos. 2005.

CASTANHEIRA, L. G. **Avaliação não clínica de produtos biológicos**. Aula da disciplina de Desenvolvimento não clínico, clínico e registro de produtos biofarmacêutico. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2018a.

CASTANHEIRA, L. G. **Pesquisa Clínica**. Aula da disciplina de Desenvolvimento não clínico, clínico e registro de produtos biofarmacêutico. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2018b.

CASTANHEIRA, L. G. **Introdução: Desenvolvimento de um novo medicamento**. Aula da disciplina de Desenvolvimento não clínico, clínico e registro de produtos biofarmacêutico. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2018c.

CENTER for Disease Control and Prevention (CDC). **Yellow Fever**. 2019a. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

CENTER for Disease Control and Prevention (CDC). **Yellow Fever Maps**. 2019b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/index.html>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

CENTER for Disease Control and Prevention (CDC). **Transmission of Yellow Fever Virus**. 2019c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

CHIPPAUX, J.P.; CHIPPAUX, A. **Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective**. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, Botucatu , v. 24, n.20, 2018 .

CIMICA, V.; GALARZA, J. M. **Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines**. Clinical Immunology, v.183, p. 99-108. 2017.

CLINICAL TRIALS. **Virus-like particles vaccines**. Disponível em: <[https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=VLP&Search=Apply&recrs=a&recrs=d&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=>](https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=VLP&Search=Apply&recrs=a&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=>)>. Acesso em: 25 nov. 2020.

DONALDSON, B. et al. **Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation.** Expert Review of Vaccines, v. 17, n.9, p.833-849. 2018.

DOUGLAS, J.M. **Conceptual Design of Chemical Processes.** Editora: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 1ª ed, Nova York, 1998.

ESPINOSA, D. et al. **Passive Transfer of Immune Sera Induced by a Zika Virus-Like Particle Vaccine Protects AG129 Mice Against Lethal Zika Virus Challenge.** EBioMedicine, v.27, p. 61-70. 2017.

ETCHEVERRIGARAY, M.; KRATJE, R. **Quality control of biotechnological products.** In: CASTILHO, L. R. **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy.** Taylor & Francis Group, 2008. cap. 13, p. 329-347.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Fendrix Hepatitis B (rDNA) Vaccine: Annex I Summary Of Product Characteristics.** 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **ICH Topic Q 5 A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin.** Londres. 1997.

FARID, S. S. **Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture.** Journal of Chromatography B, v. 848, p. 8–18, 2006.

FDA, Food and Drug Administration. **Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals.** Destinatário: Manufacturers Utilizing Cell Lines for the Production of Biologics. 1993.

FDA, Food and Drug Administration. **RabAvert: Package Insert.** 2018.

FELIPE, L. M.; LEISMANN, E. L. **Análise de viabilidade em projetos: comparação entre os métodos determinísticos e probabilísticos.** Revista de Ciência Empresarial. UNIPAR, Umuarama, v. 20, n. 1, p. 83-106, 2019.

FELIX, G. L.; DIAS, T. C. **Demonstração do Resultado do Exercício e suas Contribuições para o Ambiente Corporativo.** Id on Line Revista Multidisciplinar de Psicologia, v.13, n.43, p. 828-844, 2019.

FERREIRA, J.S.G.; CASTILHO, L.R.; PAIVA, S.P. **Produção de Pectinases para a Indústria de Bebidas.** Projeto Final de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, 1995.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Febre amarela: BioManguinhos produz até 9 milhões de doses da vacina por mês.** 2017. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/febre-amarela-BioManguinhos-produz-ate-9-milhoes-de-doses-da-vacina-por-mes>> Acesso em: 25 nov. 2020.

FRIERSON, J. G. **The Yellow Fever Vaccine: A History.** Yale Journal of Biology and Medicine, v.83, p. 77-85. 2010.

GALLO RAMIREZ, L. E. et al. **Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production.** Expert Review of Vaccines, v.14, n.9, p. 1181 – 1191. 2015.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. **Yellow Fever: A Reemerging Threat.** Clinics in Laboratory Medicine, v.30, n.1, p.237–260. 2010.

GAVI. **Yellow Fever Supply and Procurement Roadmap.** 2017 Disponível em: <https://www.gavi.org/about/market-shaping/supply-and-procurement-roadmaps/>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

GAVI. **About our Alliance.** 2020. Disponível em: <https://www.gavi.org/our-alliance/about>. Acesso em: 15 out. 2020.

GE HEALTHCARE. **Trial of Yellow Fever Inactivated Vaccine.** 2016. Disponível em:<<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00995865?recrs=e&cond=Yellow+Fever&draw=1> > Acesso em: 5 Out. 2020.

GLAXOSMITHKLINE (GSK). **Cervarix® Product Information.** 2015.

GLAXOSMITHKLINE (GSK). **Product Monograph: Engerix-B Hepatitis B Vaccine (Recombinant).** 2019.

GUTIERREZ, BRYAN J. **Financial Analysis of Biosimilar Development Candidates: A Case Study on the US Biosimilar Business.** Master's thesis, Harvard Extension School. 2015.

HAYES, E.B. **Is it time for a new yellow fever vaccine?** Vaccine, v.28, n.51, p.8073–8076. 2010.

HOMMA, A. et al. **Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica.** Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 445-458, 2011

KLEID, D.G. et al. **Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine.** Science, v.214, p.1125–1129. 1981.

LIMA, T. M. **Avaliação Técnico-Econômica Da Produção De Um Anticorpo Monoclonal Biossimilar Ao Evolocumabe No Brasil**. Orientador: Marcos B. Pinho. 2016. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

LIMA, T. M., SOUZA, M. O., CASTILHO, L. R. **Purification of flavivirus VLPs by a two-step chromatographic process**. *Vaccine*, v.37, n.47. 2019. p. 7061-7069, 2019.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**. *Rev Pan-Amaz Saúde, Ananindeua*, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MEHRA, A. **Politics of Participation: Walter Reed's Yellow-Fever Experiments**. *American Medical Association Journal of Ethics*, v.11, n.4, p. 326-330. 2009.

MELLO, I. M. V. G. C. et al. Viral vaccines: concepts, principles, and bioprocesses. *In: CASTILHO, L. R. et al. Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. [S. l.]: Taylor & Francis Group, cap. 18, p. 448, 2008.

MERCK. **Product Monograph: GARDASIL® [Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine]**. 2015

MERCK. **Product Monograph: RECOMBIVAX HB® (Hepatitis B Vaccine [Recombinant])**. 2012.

MOHSEN, M. O. et al. **Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines**, *Seminars in Immunology*, v.34, p. 123-132. 2017.

MONATH, T. P. Yellow Fever. *In: ARTENSTEIN, A. W. Vaccines: A Biography*. Nova Iorque: Springer Science & Business Media, cap. 10, p. 159-189, 2009.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F.C. **Yellow Fever**. *Journal of Clinical Virology*, v.64, p.160–173. 2015.

MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. 1ª. ed. São Paulo: Roca, 2007.

National Institutes of Health (NIH). **Phase 2 Zika vaccine trial begins in U.S., Central and South America**. 2017. Disponível em: < <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/phase-2-zika-vaccine-trial-begins-us-central-south-america> > Acesso em: 5 Out. 2020.

NICKISCH, K.; BODE-GREUEL, K. M. **NPV modelling for the selection of value-creating biosimilar development candidates.** Journal of Commercial Biotechnology, v.19, n.1, p. 24–32, 2013.

NIKOLAY, A. et al. **Process intensification of EB66<sup>®</sup> cell cultivations leads to high-yield yellow fever and Zika virus production.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.102, n.20, pp. 8725 – 8737. 2018.

NOAD, R.; ROY, P. **Virus-like particles as immunogens.** TRENDS in Microbiology, v.11, n.9, p. 438-444. 2003.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. **Zika, chikungunya and dengue: the causes and facts of new and reemerging arboviral diseases.** BMJ Global Health v.3. ed. 000530. 2017.

PAN American Health Organization (PAHO). **Control of Yellow Fever: Field Guide.** Washington D.C, 2005.

PATO, T. P. et al. Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3214-3220, 2019.

PEREIRA, R. C. et al. **An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures.** Vaccine, v.33, n.35, p. 4261-4268. 2015.

PETERS, M.S.; TIMMERHAUS, K.D. **Plant Design and Economics for Chemical Engineers**, Editora: McGraw-Hill, 4<sup>a</sup> ed., 1991.

POSSAS, C. et al. **Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 10, e180278, 2018.

RATHORE, A. P. S. **Getting A Handle On Clinical Trial Costs.** 2019. Disponível em: < <https://www.clinicalleader.com/doc/getting-a-handle-on-clinical-trial-costs-0001>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

RENDER, B. et al. **Quantitative analysis for management.** São Paulo: Pearson, 2017.

ROLDÃO, A. et al. **Virus-like particles in vaccine development.** Expert Reviews of Vaccines, v.9, n.10, p. 1149-1176. 2010.

SEGURA, T. C. A. **Projeto e Avaliação Econômica de uma Planta Industrial para Produção de Trastuzumabe no Brasil.** Orientador: Leda dos Reis Castilho. 2016. Projeto

Final (Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. f. 83.

SILVA, F. A. Q.; SIMÕES, F. A. Semiologia Urológica. *In*: JÚNIOR, A. N.; FILHO, M. Z.; REIS, R. B. 1ª ed. **Urologia Fundamental**. São Paulo: PlanMark Editora Ltda., 2010. cap. 3, p. 37-47.

SILVEIRA, C. R.; PETROCÍNIO, F. R. M.; BRAGA, J. S.. **Projeto de uma Planta para a Produção de Fator VIII recombinante**. Orientador: Ricardo de Andrade Medronho. 2005. 116 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA (SBI). **Febre amarela – Informativo para profissionais de saúde**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/sbi-famarela-saude.pdf>> Acesso em: 12 mai. 2019.

SOCIEDADE DE PEDIATRIA DE SÃO PAULO (SPSP). **Nota informativa SPSP: febre amarela**. 2017. Disponível em: <<https://www.spsp.org.br/2017/03/13/nota-informativa-spsp-febre-amarela>>. Acesso em: 15 out. 2020.

SPIRITO, M. F.; LOT, R. F. E. **Icterícia**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, ano VII, n. 12, 2009.

UNICEF. **Yellow Fever Vaccine: Current Supply Outlook**. UNICEF Supply Division, Maio de 2016. Disponível em: <[https://www.unicef.org/supply/files/YF\\_number\\_3\\_Supply\\_Update.pdf](https://www.unicef.org/supply/files/YF_number_3_Supply_Update.pdf)> Acesso em: 17 jul. 2019.

UNICEF. **Conheça a UNICEF**. 2020. Disponível em: <<https://www.unicef.org/brazil/sobre-o-unicef>>. Acesso em: 15 out. 2020.

WAYE, A.; JACOBS, P.; SCHRYVERS, A. B. **Vaccine development costs: a review**. Expert Review of Vaccines, v.12, n.12, p. 1495–1501, 2013.

WORLD Health Organization (WHO). **Hepatitis E Vaccine: Composition, Safety, Immunogenicity and Efficacy. A document prepared for Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) by the Hepatitis E Vaccine Working Group**. 2014

WORLD Health Organization (WHO), **Yellow fever: a current threat**. 2016 Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/yellow-fever/en/>> Acesso em: 12 abr. 2019.

WORLD Health Organization (WHO). **A global strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics 2017–2026**. Geneva, 2018a.

WORLD Health Organization (WHO). **Eliminating Yellow Fever Epidemics (EYE) Strategy: Meeting demands for yellow fever vaccines**. 2018b. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/disease/yellowfev/meeting-demand-for-vaccines/en/>> Acesso em: 17 de julho de 2019.

WORLD Health Organization (WHO). **Yellow fever – Brazil**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/11-february-2019-yellow-fever-brazil/en/>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

XAVIER, A. R. et al. **Febre amarela: diagnóstico laboratorial e manifestações clínicas**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.54, n.5, p.296-305. 2018.

YOSHIMOTO, N.; HASEGAWA, S.; YAMAMOTO, S. A method for designing flow-through chromatography processes. **MATEC Web of Conferences**, Japão, v. 268, 2019.

ZHANG, Y. et al. **Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial**. *The Lancet Infectious Disease*. 2020. Disponível em: < [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30843-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30843-4/fulltext)> Acesso em: 20 nov. 2020.