



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química



Projeto de uma Planta para a Produção de Fator IX Recombinante

Cristiane São Bento Gonzaga
Mariana Petrillo Cotrim
Rafael Cavaliere Ribas

Projeto Final de Curso

Orientadores
Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.
Prof^a. Flávia Chaves Alves, D.Sc.

Setembro de 2009

PROJETO DE UMA PLANTA PARA A PRODUÇÃO DE FATOR IX RECOMBINANTE

Cristiane São Bento Gonzaga

Mariana Petrillo Cotrim

Rafael Cavaliere Ribas

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheira Química.

Aprovado por:

Amaro Gomes Barreto Jr

(EQ-UFRJ)

Alvio Figueredo Cardero

(EQ-UFRJ)

Érica Conceição Fernandes Domingos

(Chemtech)

Orientado por:

Prof. Ricardo de Andrade Medronho

(EQ-UFRJ)

Profa. Flávia Chaves Alves

(EQ-UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Setembro de 2009

Gonzaga, Cristiane São Bento; Cotrim, Mariana Petrillo; Ribas, Rafael Cavaliere.
Projeto de uma planta para a produção de Fator IX Recombinante / Gonzaga, Cristiane São Bento;
Cotrim, Mariana Petrillo; Ribas, Rafael Cavaliere. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.
(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009. Orientadores:
Ricardo de Andrade Medronho, Flávia Chaves Alves.

“O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido. Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado. A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.”

Clarisse Lispector

AGRADECIMENTOS

Às nossas famílias por seu amor e paciência durante a caminhada da graduação, por seus conselhos nos momentos difíceis e sua vibração com nossas conquistas.

Aos nossos amigos pela compreensão de nossa ausência em confraternizações e por nos apoiarem em momentos de preocupação.

Aos nossos orientadores pelo vasto conhecimento transmitido a nós na elaboração do projeto, por nos incentivarem e acreditarem em nosso potencial.

Ao Ronaldo Nóbrega, do Pam-Membranas Seletivas, por sua ajuda no dimensionamento dos módulos de filtração; ao Alvio Cardero, pelas informações sobre os biorreatores e tanques; ao Luiz Amorim, da Hemobrás, pelos dados sobre hemoderivados; ao Marcio Lima, da GE HealthCare, pela cooperação no orçamento das colunas e resinas; ao Daniel Ribeiro, do LECC (COPPE), pelas noções fundamentais sobre cromatografia e expressão de DNA recombinante em células animais.

Aos nossos supervisores da Chemtech e da Petrobras por seu apoio durante nosso estágio, principalmente nessa etapa final.

Muito Obrigado!

Cristiane, Mariana e Rafael.

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

PROJETO DE UMA PLANTA PARA A PRODUÇÃO DE FATOR IX RECOMBINANTE

Cristiane São Bento Gonzaga
Mariana Petrillo Cotrim
Rafael Cavaliere Ribas

Setembro, 2009.

Orientadores: Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.
Prof^ª. Flávia Chaves Alves, D.Sc.

O fator IX é uma proteína que participa da via intrínseca da coagulação sanguínea. Sua deficiência causa a hemofilia do tipo B. O tratamento dessa doença hereditária é feito por infusão de concentrado do fator. Geralmente, esse concentrado é proveniente de fracionamento de plasma sanguíneo, que apresenta possibilidade, ainda que pequena, de estar contaminado com vírus presentes no sangue. Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas para a síntese de fator IX recombinante em que nenhuma proteína derivada de plasma humano ou animal é utilizada. Atualmente há cerca de 1300 hemofílicos no Brasil, o que acarreta um custo anual de 30 milhões de reais para a União com importação de fator IX, que não é produzido no país, para tratamento de episódios hemorrágicos.

No presente trabalho, foi dimensionada uma planta para produção de fator IX visando atender a demanda brasileira de 207 milhões de UI de fator IX para tratamento profilático da hemofilia do tipo B, no ano de 2025 (último ano de vida útil considerado para a planta, que corresponde à maior demanda). Para a síntese do fator IX recombinante, foram utilizadas células CHO cultivadas em biorreator operando em perfusão, com hidrociclone como dispositivo de separação de células; para purificação, empregaram-se processos cromatográficos e com membranas e, para a inativação viral, o método do solvente e detergente foi utilizado.

Pelas análises de viabilidade econômica realizadas, a construção de uma planta para a produção de Fator IX recombinante no Brasil seria viável, uma vez que o lucro anual foi calculado em torno de aproximadamente 60 milhões de reais e o valor presente líquido, 217 milhões para uma vida útil da planta de 10 anos; o tempo de retorno do investimento é de aproximadamente sete meses e o valor do investimento é muito próximo do gasto anual de importação do fator IX. Além disso, as análises de sensibilidade mostraram que, mesmo para variações bruscas no mercado do fator, o lucro e o valor presente líquido do projeto se manteriam positivos, garantindo segurança ao projeto.

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Chemical Engineer.

PROJECT OF A PLANT FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT FACTOR IX

Cristiane São Bento Gonzaga
Mariana Petrillo Cotrim
Rafael Cavaliere Ribas

September, 2009.

Supervisors: Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.
Flávia Chaves Alves, D.Sc.

Factor IX is a protein that participates in the intrinsic pathway of blood coagulation. Its deficiency causes hemophilia type B. The treatment of this hereditary disease is done by infusion of factor IX concentrate. Usually this concentrate is derived from blood plasma fractionation, which presents the possibility, however slight, of being contaminated with viruses present in the blood. In recent years, techniques have been developed for the synthesis of recombinant factor IX in which no protein derived from human plasma or animal is used. Currently there are around 1,300 hemophiliacs in Brazil, which demand an annual cost of 30 million reais for the importation of factor IX, which is not produced in the country, for treatment of bleeding episodes.

In this work a plant for production of factor IX was designed in order to meet Brazilian demand of 207 million IU of factor IX in prophylactic treatment of hemophilia type B in the year 2025 (last year of the useful life considered for the plant, which corresponds to the highest demand). CHO cells were used for the synthesis of recombinant factor IX. Those cells were cultured in a bioreactor operating in perfusion using a hydrocyclone as the cell separation device; for purification, chromatographic columns and membranes were employed, and for the viral inactivation, the solvent and detergent was the chosen method.

Based on a financial feasibility analysis, it was possible to conclude that the construction of a plant for the production of recombinant Factor IX in Brazil would be feasible since the annual profit was estimated at around about 60 million reais and net present value was 217 million for a plant life of 10 years; the investment return time is around seven months and the investment value is very close to the annual cost of importing factor IX. Also, the sensitivity analysis showed that even with abrupt changes in the factor market, profit and net present value of the project would remain positive, guaranteeing security to the project.

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Hemostasia e a Coagulação Sanguínea.....	4
2.1.1	Constricção Vascular (Espasmo Vascular).....	4
2.1.2	Formação do Tampão Plaquetário	4
2.1.3	Coagulação Sanguínea.....	5
2.2	Hemofilia	11
2.3	Produção de Fator IX.....	13
2.3.1	pdIX – Fracionamento do Plasma.....	13
2.3.2	rFIX – DNA Recombinante.....	15
2.4	Expressão de proteínas recombinantes em células animais.....	17
2.4.1	Técnica do DNA recombinante	18
2.4.2	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	18
2.4.3	Enzimas de Restrição.....	19
2.4.4	Clonagem.....	22
2.4.4.1	Plasmídeos	22
2.4.5	Transferência de Genes.....	23
2.5	Cultivo de Células Animais	24
2.5.1	Processos de Cultivo Celular.....	25
2.5.2	Equipamentos para retenção celular em cultivos em perfusão	26
2.5.2.1	Centrífugas.....	27
2.5.2.2	Hidrociclones.....	27
2.5.2.3	Sedimentadores Gravitacionais.....	29
2.5.2.4	Filtros de Malha Rotativa	29
2.5.2.5	Filtração Tangencial	30
2.5.2.6	Filtração Dinâmica.....	31

2.5.2.7	Separação Ultrassônica.....	32
2.5.2.8	Separação Dieletrorética.....	32
2.6	Processos de Purificação.....	34
2.6.1	Cromatografia.....	34
2.6.1.1	Cromatografia de Troca Iônica.....	35
2.6.1.2	Cromatografia de Afinidade	36
2.6.1.3	Cromatografia de Exclusão ou Filtração em Gel.....	37
2.6.2	Processos de Separação por Membranas	38
2.7	Inativação Viral	40
3	ANÁLISE DE MERCADO	42
3.1	Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos.....	42
3.2	Estimativa da Demanda Brasileira de Fator IX	44
4	APRESENTAÇÃO DO PROJETO	46
4.1	Descrição do Processo	46
4.2	Classificação das Áreas da Planta.....	52
4.3	Fluxogramas	56
4.4	Lista de Equipamentos.....	62
4.5	Lista de Linhas.....	63
5	DIMENSIONAMENTO DA PLANTA	65
5.1	BRT-10003: Biorretor em Perfusão.....	65
5.1.1	Folha de Especificações de BRT-10003	68
5.2	BRT-10001 e BRT-10002: Biorreatores em Batelada.....	69
5.2.1	Folha de Especificações de BRT-10001	70
5.2.2	Folha de Especificações de BRT-10002	70
5.3	SPN-10001 e SPN-10002: Spinners	71
5.4	HCL-100001: Hidrociclone	71
5.4.1	Folha de Especificações de HCL-100001	74
5.5	TQE-10001: Tanque de Equalização.....	75

5.5.1	Folha de Especificações de TQE-10001	75
5.6	MFL-20001: Sistema de Microfiltração	75
5.6.1	Folha de Especificações de MFL-20001.....	77
5.7	TQE-20001: Tanque de Equalização.....	78
5.7.1	Folha de Especificações de TQE-20001	78
5.8	TQD-20001: Tanque de Dialisante.....	79
5.8.1	Folha de Especificações de TQD-20001.....	80
5.9	UFL-20001: Sistema de Ultrafiltração	80
5.9.1	Folha de Especificações de UFL-20001	82
5.10	TQE-20002: Tanque de Equalização.....	82
5.10.1	Folha de Especificações de TQE-20002.....	82
5.11	CTA-20001: Coluna de Troca Aniônica.....	83
5.11.1	Folha de Especificações de CTA-20001.....	87
5.12	TQE-20003: Tanque de Equalização.....	88
5.12.1	Folha de Especificações de TQE-20003.....	88
5.13	CAF-20001: Coluna de Afinidade.....	89
5.13.1	Folha de Especificações de CAF-20001	91
5.14	TQE-20004: Tanque de Equalização.....	92
5.14.1	Folha de Especificações de TQE-20004.....	92
5.15	CTA-20002: Coluna de Troca Aniônica.....	93
5.15.1	Folha de Especificações de CTA-20002.....	96
5.16	TQE-20005: Tanque de Equalização.....	96
5.16.1	Folha de Especificações de TQE-20005.....	97
5.17	CAM-20001: Coluna de Afinidade com Metal Imobilizado	97
5.17.1	Folha de Especificações de CAM-20001.....	100
5.18	TQE-20006: Tanque de Equalização.....	101
5.18.1	Folha de Especificações de TQE-20006.....	101
5.19	UFL-20002: Sistema de Ultrafiltração	102

5.19.1	Folha de Especificações de UFL-20002	103
5.20	TQI-20001: Tanque de Inativação Viral.....	104
5.20.1	Folha de Especificações de TQI-20001	105
5.21	TQD-20002: Tanque de Dialisante.....	105
5.21.1	Folha de Especificações de TQD-20002.....	107
5.22	UFL-20003: Sistema de Ultrafiltração	107
5.22.1	Folha de Especificações de UFL-20003	109
5.23	TQF-20001: Tanque de Formulação.....	110
5.23.1	Folha de Especificações de TQF-20001	112
5.24	ENV-30001: Envasadora	113
5.24.1	Folha de Especificações de ENV-30001.....	114
5.25	LIO-30001: Liofilizador	114
5.25.1	Folha de Especificações de LIO-30001	115
5.26	Dimensionamento da Área Útil da Planta.....	116
5.27	Cálculo do Tempo de Purificação do Fator IX Recombinante	116
6	ESTIMATIVA DE CUSTOS E ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA	118
6.1	Introdução	118
6.2	Estimativa de Custos.....	118
6.2.1	Investimento Total	119
6.2.2	Custos de Produção.....	124
6.3	Análise de Viabilidade Econômica.....	127
6.3.1	Valor Presente Líquido	127
6.3.2	Tempo de Retorno	130
6.3.3	Taxa Interna de Retorno	130
6.3.4	Análise de Sensibilidade.....	131
6.3.4.1	Ponto de Nivelamento.....	131
6.3.4.2	Sensibilidade do lucro em relação ao preço de venda do produto.....	132
6.3.4.3	Sensibilidade do VPL em relação ao investimento.....	133

6.3.4.4	Sensibilidade do VPL em relação ao custo de matérias-primas	134
6.3.4.5	Sensibilidade do VPL em relação ao preço de venda do produto.....	135
6.3.4.6	Comparação entre as Análises de Sensibilidade.....	136
7	CONCLUSÕES	138
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
9	ANEXOS	145
9.1	Equações e Cálculos para o Dimensionamento do Biorretor em Perfusão.....	145
9.2	Equações para o Dimensionamento de Biorreatores e Spinners em Batelada.....	146
9.3	Equações para o Dimensionamento de Biorreatores e Spinners em Batelada.....	146

Uma definição geral de biotecnologia é a manipulação de organismos biológicos para a síntese de produtos para o benefício dos seres humanos. ^[1] No entanto, há diversas definições para biotecnologia, o que demonstra que esse é um campo multidisciplinar.

A prática da biotecnologia já é realizada há milhares de anos para fabricação de produtos por fermentação como vinho, cerveja, pão e queijo, mas adquiriu uma nova definição e percepção pública nos últimos vinte anos. O primeiro uso do termo biotecnologia pode ser datado de 1917, quando foi utilizado para se referir à produção industrial de materiais, tais como acetona utilizada na síntese de um explosivo.

A era moderna da biotecnologia teve início em 1953, quando Watson e Crick descobriram a estrutura do DNA ^[2]. Em 1958, Crick relacionou o DNA, o RNA e as proteínas, salientando o fluxo unidirecional da informação do DNA à proteína ^[3]. Nas décadas de 60 e de 70, foi descoberta a polimerase, enzima de restrição que catalisa a síntese de DNA e o RNA mensageiro e em 1973, Paul Berg obteve a primeira molécula de DNA. O surgimento da indústria de biofármacos se deu na metade dos anos 70 e nos anos 80 foi comercializada a primeira droga recombinante, a insulina.

Realizações modernas dessa indústria incluem a transferência de genes específicos de um organismo para o outro, pesquisa com células tronco humanas, clonagem e fusão de diferentes tipos de células para produção de medicamento. A biotecnologia atualmente é reconhecida como a ciência que engloba todas essas técnicas ^[2].

A hemofilia do tipo B é uma doença hemorrágica hereditária que afeta quase exclusivamente homens por ser um defeito recessivo no cromossomo sexual X. É caracterizada por deficiência ou anormalidade do fator de coagulação IX, que é uma proteína presente no plasma sanguíneo. Sua ocorrência se dá em aproximadamente 1 a cada 50.000 homens e seu tratamento consiste na administração parental de concentrado de fator IX. A quantidade de infusão depende da gravidade do sangramento e do porte do paciente

A obtenção de fator IX se deu inicialmente por fracionamento de plasma sanguíneo, mas hoje em dia ele também pode ser obtido pela técnica de DNA recombinante. No caso do fator IX derivado de plasma sanguíneo (pdFIX), sua obtenção direta através de materiais biológicos contaminados resultou em uma via de transmissão de doenças devido a vírus presentes no sangue, como os das hepatites B e C e do HIV ^[4]. Já no processo de obtenção do fator IX recombinante (rFIX), nenhuma proteína derivada de plasma humano ou animal é utilizada, o que torna o rFIX consideravelmente menos suscetível a contaminação viral ^[5].

Atualmente, cerca de 1300 brasileiros são portadores da hemofilia tipo B e o Ministério da Saúde gasta cerca de 30 milhões de reais por ano com importação de fator IX para tratamento de episódios hemorrágicos.

Devido a este cenário, surgiu o interesse em estudar o processo de produção de Fator IX recombinante, com o objetivo de projetar uma indústria para a produção deste biofármaco, visando atender à demanda brasileira para tratamento profilático, para proporcionar melhor qualidade de vida para os hemofílicos.

Em 2005, Silveira et al. ^[15] projetaram uma planta para produção de fator VIII recombinante no Brasil, em projeto final de curso apresentado à Escola de Química. Atualmente, a planta projetada está sendo desenvolvida pela COPPE.

O presente trabalho tem como objetivo o projeto de uma planta para produção de fator IX recombinante tomando como base a metodologia adotada por Silveira et al. ^[15]. Dessa maneira, serão dimensionados os principais equipamentos presentes nas etapas de produção do fator, desde sua síntese até sua apresentação em produto final, esquematizadas na Figura 1.

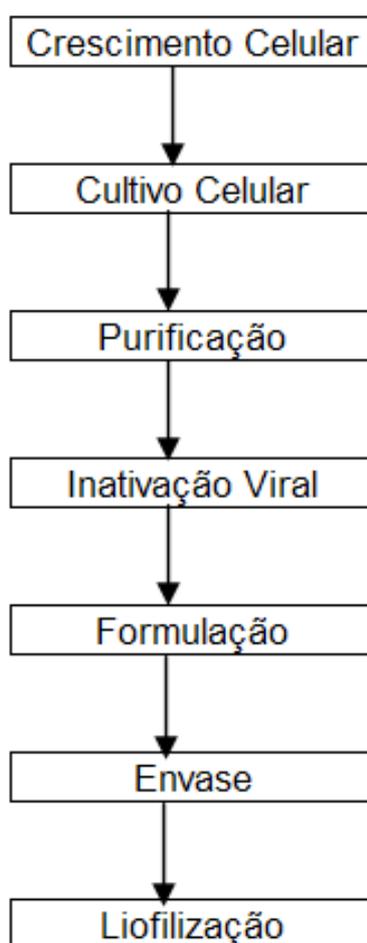


Figura 1. Etapas para Produção de Fator IX Recombinante.

Após o dimensionamento do processo, serão realizadas análise de viabilidade econômica, para avaliar se a planta proposta será viável no cenário atual de comercialização de fator IX, e análises de sensibilidade, para verificar a rentabilidade da planta em diversos cenários.

2.1 Hemostasia e a Coagulação Sanguínea

O termo hemostasia significa prevenção da perda de sangue. Toda vez que um vaso sanguíneo sofre lesão ou ruptura a hemostasia é mantida por meio de mecanismos distintos, que incluem:

- Constrição vascular;
- Formação de tampão plaquetário;
- Coagulação sanguínea;
- Crescimento de tecido fibroso no coágulo.

2.1.1 Constrição Vascular (Espasmo Vascular)

Após a ruptura do vaso sanguíneo, o estímulo desse vaso traumatizado determina a contração de sua parede, o que imediatamente reduz o fluxo sanguíneo pelo vaso. Essa contração resulta de reflexos nervosos do espasmo miogênico local, fatores alcalóides locais dos tecidos traumatizados e das plaquetas e de reflexos nervosos. Todavia, grande parte da constrição resulta, provavelmente, da contração miogênica local dos vasos lesados. ^[6]

Quanto maior a gravidade do trauma causado ao vaso, maior será o grau do espasmo, que pode durar vários minutos ou mesmo horas, tempo no qual ocorrem os processos de formação dos tampões plaquetários e de coagulação do sangue.

2.1.2 Formação do Tampão Plaquetário

Se o corte no vaso sanguíneo for muito pequeno, sendo que diversas rupturas vasculares muito pequenas se desenvolvem em todo corpo diariamente, ele é selado por um tampão plaquetário, em vez de por um coágulo sanguíneo.

As plaquetas, também conhecidas como trombócitos, são diminutos discos de 1 a 4 micra de diâmetro formados na medula óssea. Elas possuem características funcionais de células completas, mesmo não possuindo núcleo, o que impossibilita sua reprodução.

Quando entram em contato com uma superfície vascular lesada, as plaquetas mudam de forma drástica suas características. Começam a se dilatar, assumem formas irregulares com prolongamentos, suas proteínas sofrem contração e liberam grânulos contendo múltiplos fatores

ativos, tornam-se pegajosas, de modo que aderem ao colágeno e secretam grandes quantidades de ADP. ^[6] Essa facilidade que as plaquetas têm de aderir ao colágeno (liberado em superfícies lesadas), forma um conglomerado viscoso, chamado de tampão plaquetário. A Figura 2 mostra a formação do tampão plaquetário.



Figura 2. Formação do Tampão Plaquetário ^[7].

2.1.3 Coagulação Sanguínea

Quando há um trauma na parede vascular, substâncias ativadoras, produzidas pelas plaquetas e pelas proteínas sanguíneas que se aderem à parede vascular traumatizada iniciam o processo de coagulação. A abertura do vaso é preenchida pelo coágulo, após um período de tempo o coágulo se retrai e essa contração fecha ainda mais o vaso. A Figura 3 ilustra o processo de coagulação em um vaso sanguíneo traumatizado.



Figura 3. Processo de Coagulação em um Vaso Sanguíneo Traumatizado ^[6].

Mais de cinquenta substâncias importantes que causam ou afetam a coagulação sanguínea são encontrados no sangue ou nos tecidos. Algumas substâncias promovem a coagulação e são conhecidas como pró-coagulantes, enquanto outras inibem a coagulação, sendo conhecidas como

anticoagulantes. A coagulação ou não do sangue depende do grau de equilíbrio entre estes dois grupos de substâncias. O sangue não coagula em condições normais, nas quais há predominância de anticoagulantes. Entretanto, quando ocorre a ruptura de algum vaso, os pró-coagulantes na área da lesão tornam-se ativos e sobrepujam os anti-coagulantes, com conseqüente desenvolvimento de um coágulo.

A coagulação ocorre em três etapas ^[6], esquematizadas na Figura 4:

- Em resposta à ruptura do vaso ou a problemas relacionados ao próprio sangue, ocorre neste uma complexa cascata de reações químicas, segundo diziam Macfarlane e Davie & Ratnoff em 1964 ^[8], com participação de mais de uma dúzia de fatores de coagulação sanguínea, sendo o resultado efetivo a formação de um complexo de substâncias ativadas chamado de ativador da protombina;
- O ativador da protombina catalisa a conversão da protombina em trombina;
- A trombina atua como uma enzima, convertendo o fibrinogênio em fibras de fibrina, formando um emaranhado de plaquetas, células sanguíneas e plasma, para formar o coágulo.

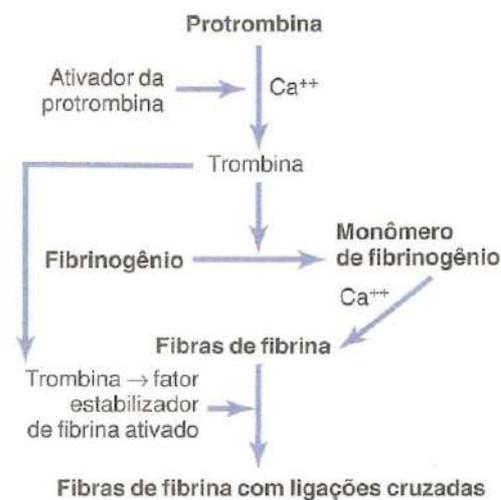


Figura 4. Esquema para conversão de protombina em trombina e polimerização do fibrinogênio para formar fibras de fibrina ^[6].

Formação do Ativador da Protombina

Os mecanismos que iniciam a coagulação são desencadeados por trauma a uma parede vascular e tecidos adjacentes, trauma ao sangue ou contato do sangue com células endotéliais lesionadas, que levam à formação do ativador da protombina.

Considera-se que este seja formado por duas vias, que, na realidade, interagem constantemente entre si ^[6]:

- Via Extrínseca: começa com o trauma à parede vascular e aos tecidos vizinhos;
- Via Intrínseca: começa no próprio sangue.

Em ambas as vias, uma série de diferentes proteínas plasmáticas, chamadas de fatores de coagulação sanguínea, possuem um papel fundamental. Em sua maioria, esses fatores são formas inativas de enzimas proteolíticas que, quando convertidas a suas formas ativas, suas ações enzimáticas causam as sucessivas reações em cascata do processo de coagulação. Os fatores são designados por algarismos romanos e para indicar sua forma ativa, a letra minúscula “a” é acrescentada ao algarismo romano. A Tabela 1 lista os fatores de coagulação do sangue, seus sinônimos e as vias em que atuam.

Tabela 1 – Fatores de Coagulação, seus Sinônimos e as Vias em que Atuam ^{[4], [6]}.

Número do Fator	Nome Usual	Via em que Atua
Fator I	Fibrinogênio	Ambas
Fator II	Protrombina	Ambas
Fator III	Tromboplastina tecidual, Fator tecidual	Extrínseca
Fator IV	Íon de cálcio	Ambas
Fator V	Proacelerina, Fator Lábil, Ac-globulina (Ac-G)	Ambas
Fator VII	Acelerador da conversão sérica da protrombina (ASPC), Pró-convertina, Fator estável	Extrínseca
Fator VIII	Fator anti-hemofílico (AHF), Globulina anti-hemofílica (GAH), Fator anti-hemofílico A	Intrínseca
Fator IX	Componente da tromboplastina plasmática (CTP), Fator de Christmas (CF), Fator anti-hemofílico B	Intrínseca
Fator X	Fator Stuart, Fator Stuart-Power, Fator Power, Autoprotrombina I _c	Ambas
Fator XI	Antecedente plasmático da tromboplastina (ATP), Fator anti-hemofílico C	Intrínseca
Fator XII	Fator Hageman	Intrínseca
Fator XIII	Trombocinase, Tromboplastina completa, Fator estabilizante de fibrina, Ativador da protrombina	Ambas

Além dos fatores de coagulação listados na Tabela 1, também atuam na coagulação as plaquetas, a pré-caliceína (Fator de Fletcher) e o cininogênio de alto peso molecular (Fator de Fitzgerald) ^[6].

➤ **Via Extrínseca:**

A via extrínseca tem início com o trauma na parede vascular ou trauma dos tecidos extravasculares que entram em contato com o sangue, o que leva às seguintes etapas, esquematizadas na Figura 5:

- *Liberção do Fator III:* O tecido traumatizado libera um complexo de diversos fatores, chamado fator III, composto por fosfolípídios das membranas dos tecidos mais um complexo lipoprotéico que atua principalmente como enzima proteolítica;
- *Ativação do Fator X – papel do fator VII e do fator tecidual:* O complexo lipoprotéico do fator III se combina com o fator VII e, em presença de íons cálcio, atua enzimaticamente sobre o fator X, para forma o fator X ativado (Xa);
- *Efeito do fator Xa para formar o ativador da protombina – o papel do fator V:* O fator Xa se combina imediatamente com os fosfolípídios teciduais do fator III ou com fosfolípídios adicionais liberados pelas plaquetas, além de com o fator V, para formar o complexo ativador da protombina. No complexo ativador da protombina, inicialmente, o fator V no ativado, n se encontra inativo, mas no instante em que o processo de coagulação procede de modo a transformar a protombina em trombina, a ação proteolítica da trombina ativa o fator V, que passa a ser um potente ativador da formação de trombina. O fator Xa é a verdadeira protease causadora da clivagem da protombina para formação de trombina.

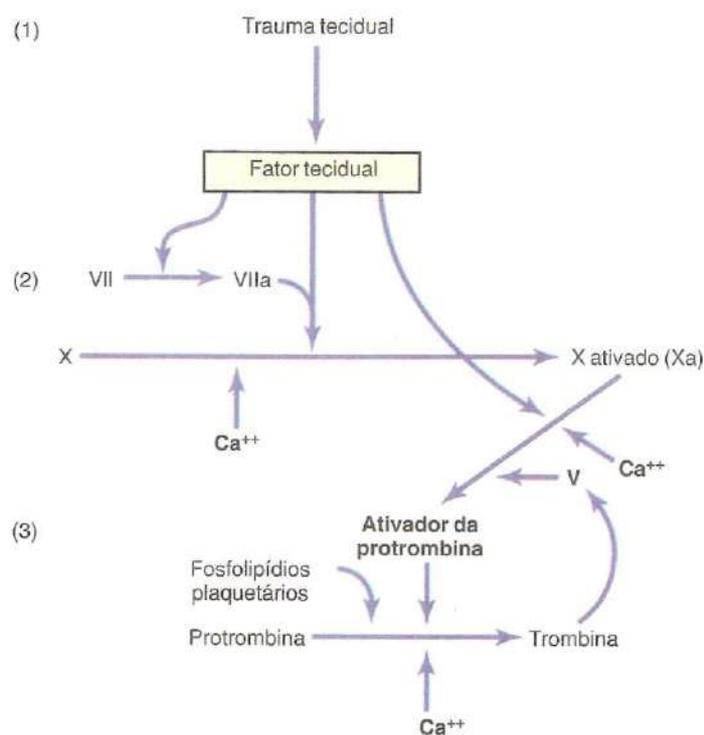


Figura 5. Esquema da Via Extrínseca para Desencadeamento da Coagulação ^[6].

➤ **Via Intrínseca:**

A via intrínseca tem início com o trauma ao próprio sangue ou à exposição do sangue ao colágeno da parede vascular traumatizada, o que leva às seguintes reações em cascata, esquematizadas na Figura 6:

- *O trauma sanguíneo causa ativação do fator VII e liberação dos fosfolipídios das plaquetas:* Esse evento altera o fator VII a fator VII ativado (fator VIIa) e as plaquetas, causando a liberação de fosfolipídios plaquetários que contém a lipoproteína chamada fator plaquetário 3, que tem participação nas reações seguintes;
- *Ativação do fator XI pelo fator VIIa:* O fator VIIa atua enzimaticamente sobre o fator XI, ativando-o também. Além disso, essa etapa necessita do cininogênio de alto peso molecular (APM) e é acelerada pela pré-caliceína;
- *Ativação do Fator IX pelo fator XIa:* O fator XIa atua enzimaticamente sobre o fator IX para ativá-lo;
- *Ativação do fator X – o papel do fator VIII:* O fator IX, juntamente com o fator VIIIa e os fosfolipídios plaquetários ativa o fator X;
- *Ação do fator Xa na formação do ativador da protombina – o papel do fator V:* Essa etapa é a mesma etapa final da via extrínseca.

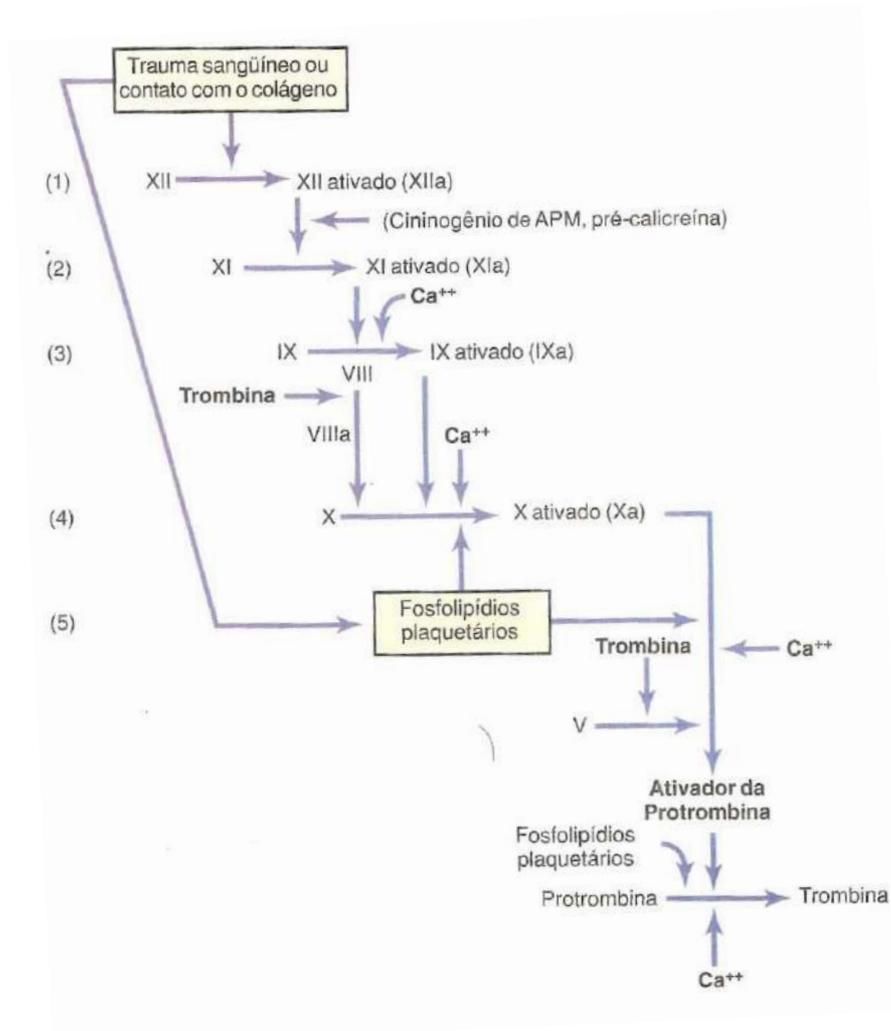


Figura 6. Esquema da Via Intrínseca para Desencadeamento da Coagulação [6].

Conversão de Protombina a Trombina

O ativador da protombina, em presença de quantidade significativa de íons de cálcio, gera a conversão da protombina a trombina. Em seguida a trombina causa a polimerização das moléculas de fibrinogênio em fibras de fibrina, sendo que o fator limitador da coagulação é geralmente a formação do ativador da protombina.

As plaquetas possuem um papel importante na conversão da protombina a trombina, pois grande parte da protombina se fixa inicialmente aos receptores de protombina nas plaquetas já ligadas ao tecido lesado.

Conversão de Fibrinogênio a Fibrina

A trombina é uma enzima protéica com fraca capacidade proteolítica que atua sobre o fibrinogênio, removendo quatro peptídeos de baixo peso molecular e formando uma molécula de monômero de fibrina que tem capacidade automática de se polimerizar. Dessa maneira, rapidamente os monômeros são polimerizados em longas fibras de fibrina, que constituem o retículo do coágulo sanguíneo.

O coágulo é composto por rede de fibras de fibrinas que cursam em todas as direções e que retém células sanguíneas, plaquetas e plasma. As fibras de fibrina também aderem às superfícies lesadas dos vasos sanguíneos, fazendo com que o coágulo fique aderido a qualquer abertura vascular, impedindo a perda de sangue, como na Figura 7, que mostra a seção transversal de um coágulo.

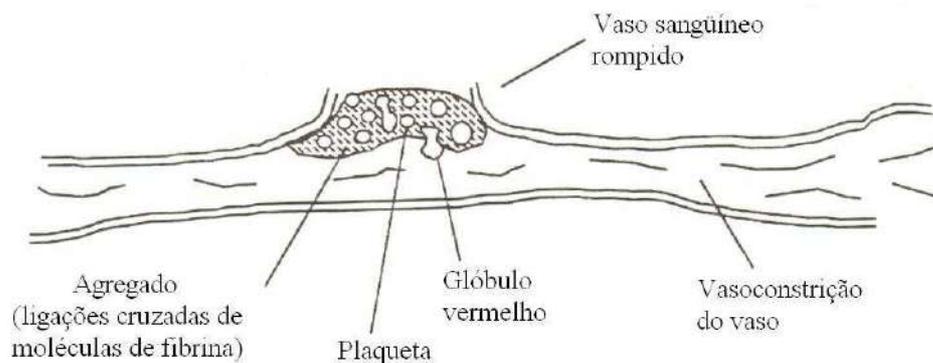


Figura 7. Seção Transversal de um Coágulo Sanguíneo ^[4].

2.2 Hemofilia

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária causada por defeito recessivo no cromossomo sexual X. Dessa maneira, quase que exclusivamente homens são afetados, uma vez que, para que mulheres sejam hemofílicas, é necessário que elas possuam os dois cromossomos X com o defeito recessivo e, quando possuem apenas um, são consideradas portadoras de hemofilia, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Genótipo e Fenótipos de Hemofilia em Função do Sexo ^[76].

Sexo	Genótipo	Fenótipo
Masculino	XHY	Homem Normal
	XhY	Homem Hemofílico
Feminino	XHXH	Mulher Normal
	XHXh	Mulher Normal Portadora
	XhXh	Mulher Hemofílica

A maioria dos casos de doenças hemorrágicas corresponde à hemofilia e outras doenças hemorrágicas menos frequentes são a doença de Von Willebrand e deficiência de fatores II, V, VII, X, XI e XIII.

A hemofilia do tipo A é caracterizada pela deficiência do fator VIII de coagulação sanguínea e a hemofilia do tipo B, pela deficiência do fator IX de coagulação sanguínea. O índice de incidência de hemofilia é de 85% do tipo A e 15% do tipo B. A hemofilia do tipo B afeta 1 a cada 50000 homens.

O quadro clínico da hemofilia depende do nível plasmático do fator de coagulação, sendo classificado como grave, moderado ou leve. Na hemofilia grave o nível plasmático do fator é menor que 1% (0,01 U/mL) e os sintomas são hemorragias e hemartroses espontâneas; na moderada, entre 1 a 5% do normal (0,01 a 0,05 U/mL) com hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias; na leve, entre 5 a 25% do normal (0,05 a 0,25 U/mL), com hemorragias secundárias a traumas ou cirurgias e raras hemorragias espontâneas.

Para tratamento da hemofilia é necessária a reposição do fator deficiente. Na hemofilia do tipo B, o fator IX pode ser repostado por infusão de fator IX derivado de plasma sanguíneo (pdFIX) ou por fator IX recombinante (rFIX). Dependendo do grau de déficit dos fatores, os portadores de hemofilia não podem viver sem sua reposição, sendo considerados medicamentos essenciais. As doses e o tempo de tratamento para cada paciente dependem do lugar onde ocorre o evento hemorrágico e da gravidade do déficit do fator. São menos graves as hemorragias da cavidade oral e das articulações, que em geral necessitam manter o nível dos fatores em 30% do nível ideal. Já as hemorragias que ocorrem nos músculos, nas cirurgias de médio porte, como também nas extrações dentárias são consideradas hemorragias maiores, necessitando manter o nível de fator deficitário em torno de 40 a 45%. Em cirurgias de grande porte, fraturas, hemorragias gastrointestinais, intra-abdominais e intracranianas, os níveis precisam ser mantidos em torno de 50 a 75% em uma primeira fase, para cessar a hemorragia e em 30-50% numa segunda fase para prevenção de reincidência ^[9]. Além disso, quanto mais severo o grau hemorrágico, maior o tempo do tratamento de infusão.

2.3 Produção de Fator IX

Como mencionado anteriormente, há dois tipos de fator IX para ser repostos nos hemofílicos. O pdFIX é obtido a partir do fracionamento de plasma sanguíneo e o rFIX, através de células animais geneticamente modificadas. Nos tópicos a seguir serão descritos os processos comerciais de produção do fator IX.

2.3.1 pdIX – Fracionamento do Plasma

Em relação aos componentes sanguíneos, os concentrados de hemácias, plaquetas e leucócitos e plasma (parte líquida do sangue) são chamados de hemocomponentes, enquanto as proteínas extraídas do plasma industrialmente (fatores de coagulação, albumina, imunoglobinas, entre outros) são chamadas de hemoderivados.

Quando o plasma é congelado em um período de até oito horas após a coleta de sangue, pode ser congelado por um ano a -20°C ou por dois anos a -30°C para uso em transfusões ou para a produção industrial de fatores de coagulação, denominado plasma fresco congelado (PFC) ^[9].

Para fracionamento do plasma, é necessário considerar como aspectos técnicos a disponibilidade do plasma, sua qualidade, a tecnologia de produção e a segurança e eficácia dos produtos.

No que diz respeito à disponibilidade do plasma, é importante ressaltar que a comercialização do sangue, seus componentes e derivados é vedada pela Lei 10.205 (março de 2001) da Constituição Federal brasileira.

A qualidade e segurança do plasma são fatores de extrema importância principalmente por este ser de origem biológica, ou seja, há um risco muito grande de contaminação por diversos agentes contagiosos. Há uma grande preocupação com infecções virais por HIV (AIDS), HBV e HCV (hepatite), entretanto, há uma prevalência muito maior de infecções bacterianas.

Essa preocupação teve início com o surgimento da AIDS na década de 80, com a contaminação de diversos hemofílicos por infusão de hemoderivados contaminados nas décadas de 60 e 70. Desde então, as indústrias fracionadoras de plasma e os pesquisadores voltaram seus esforços para desenvolver novas tecnologias capazes de disponibilizar produtos com segurança.

Para diminuir tanto infecções virais quanto bacterianas, para doação de sangue, há entrevista detalhada do histórico do candidato a doador, rigorosa assepsia do local de punção da coleta de sangue e rigoroso controle de qualidade dos laboratórios que realizam os testes de triagem de sangue de doadores. Também há a questão da rastreabilidade de todo sangue, componentes e derivados utilizados para fins terapêuticos, sendo possível conhecer sua origem, ou

seja, o doador que deu origem a uma determinada doação que possa vir a causar algum dano ao receptor.

No entanto, sabe-se que os meios disponíveis para identificação de contaminação no sangue de um doador não são 100% eficazes, uma vez que os vírus podem estar em algum estado de latência em que não conseguem ser identificados no momento do teste, o que é confirmado por identificação de surtos de hepatite A e transmissão de parvovírus em hemofílicos tratados exclusivamente com concentrados de fatores de coagulação considerados seguros. Também há a questão de contaminação por príons, causando uma nova variação da doença de Creutzfeldt-Jakob, mas nunca nenhum caso foi confirmado ^[5].

Quanto à tecnologia de fracionamento de plasma, esta teve impulso na Segunda Guerra Mundial com a introdução de técnicas de coleta de sangue em frascos de vidro, congelamento, e liofilização de plasma, o que possibilitou o processo de extração industrial de hemoderivados por métodos físico-químicos.

Em 1906, foi publicado um trabalho descrevendo o mecanismo de um aparelho de liofilização, processo para extração de água do plasma, obtendo-se plasma liofilizado. Em 1946, foi desenvolvida a técnica de precipitação de proteínas plasmáticas com o uso do etanol, isolando a albumina. Na década de 60, a partir de plasma fresco congelado (PFC), teve início o uso do crioprecipitado, precipitado de fatores de coagulação a frio, no tratamento de hemorragias de hemofílicos. No início da década de 70, a liofilização foi introduzida para obtenção de crioprecipitado para uso em hemofílicos e, no final dessa década, fatores de coagulação liofilizados foram introduzidos no tratamento destes, até o surgimento de contaminação pelos vírus da AIDS e da hepatite. Então com o desenvolvimento de novas tecnologias, como já ressaltado anteriormente, em 1985 foi introduzido o primeiro método de inativação viral, o calor seco, seguido do método do solvente-detergente que o superou por diminuir significativamente as perdas de fatores durante o processo. Essas tecnologias permitiram o fracionamento dos fatores mais seguros, sendo prescrito o uso de plasma e do crio “in natura” ou liofilizados, assim como o uso de concentrados de fatores liofilizados em portadores de hemofilia ^[9].

Para se obter concentrados de fatores sanguíneos atualmente são fundamentais as etapas descritas na Figura 8.

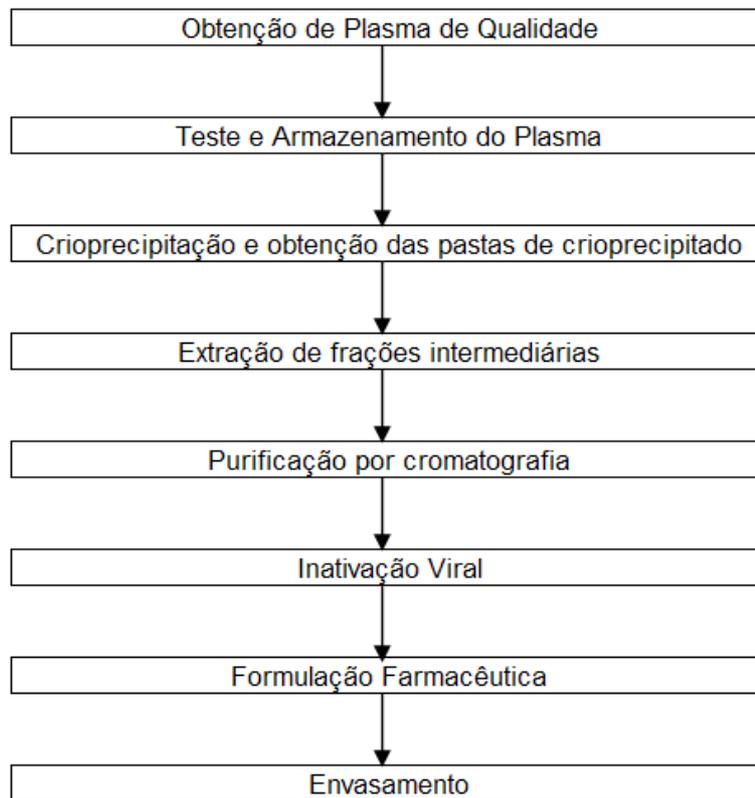


Figura 8. Obtenção de Fator IX através de Plasma Sanguíneo.

2.3.2 rFIX – DNA Recombinante

Devido a toda preocupação de transmissão de doenças por utilização de sangue contaminado na produção de fatores de coagulação e aos avanços da biotecnologia, surgiu a produção destes pela tecnologia de DNA recombinante em células animais. Sendo assim, o sangue passou a não ser mais o único caminho para produção dos fatores ^[4].

Por essa tecnologia, os fatores, que são proteínas, são sintetizados a partir de células animais que possuam expressão da proteína de interesse. No caso da síntese de rFIX, nenhuma proteína derivada de plasma humano ou animal é utilizada, o que torna o rFIX consideravelmente menos suscetível a contaminação viral ^[5].

O gene humano responsável pela produção de fator IX foi sintetizado pela primeira vez há duas décadas, mas o desenvolvimento de rFIX para uso clínico foi dificultado pelas complexas modificações pós-traducionais necessárias à biossíntese do rFIX. No entanto, essa barreira foi superada e o rFIX já se encontra disponível. Comercialmente para tratamento da hemofilia B por infusão, ele é vendido com o nome de BeneFIX, da Wyeth.

O processo de produção do BeneFIX está baseado nas patentes de Kaufman et al. [48] e Foster et al [47] e também é descrito por Walsh [49]. Kaufman apresenta a síntese, de alto rendimento, de fator IX recombinante ativo utilizando células geneticamente da linhagem CHO e Foster, processos de purificação para fator IX recombinante. Walsh sintetiza os processos utilizados por Kaufman e Foster e os conecta por etapa de cultivo celular.

As Figuras 9 e 10 esquematizam, respectivamente, os processos para a produção de fator IX recombinante propostos por Foster e Walsh.

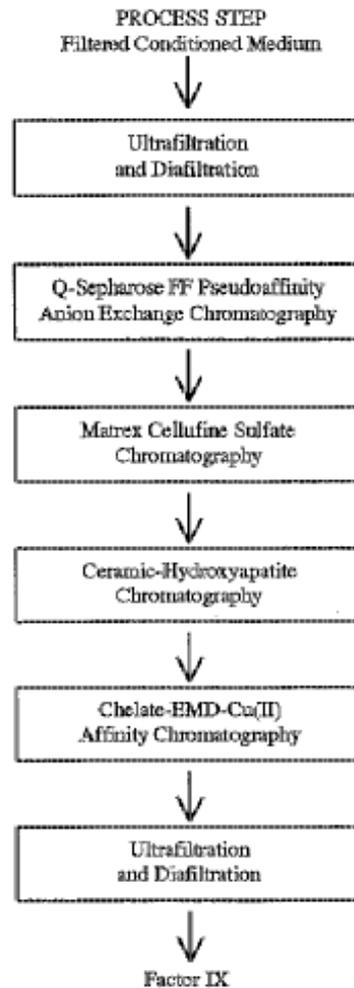


Figura 9. Esquema de Purificação de Fator IX Recombinante Proposto por Foster et al. [47].

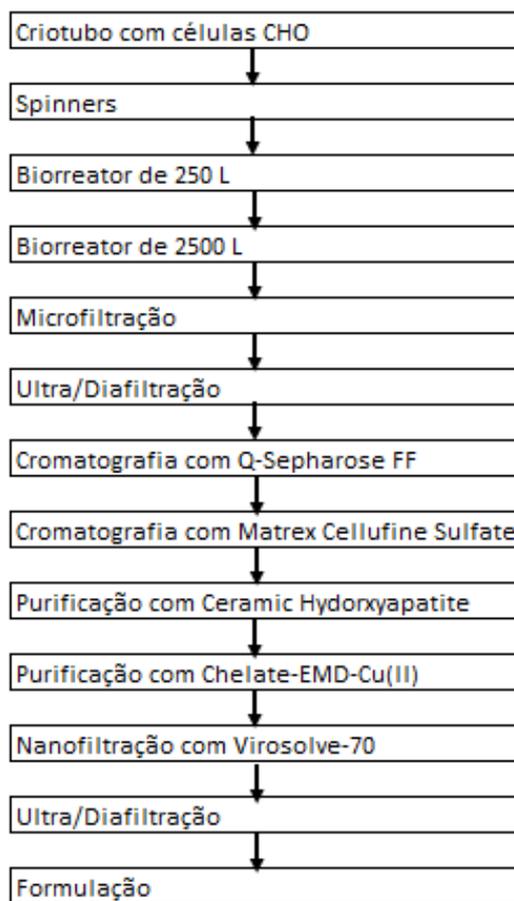


Figura 10. Esquema de Produção de Fator IX Recombinante Proposto por Walsh ^[49].

O BeneFIX é comercializado sob forma de pó liofilizado em frascos de 10 mL contendo 250, 500, 1000 ou 2000 UI, junto com seringa de 10 mL contendo 5 mL de solução tampão para diluição do fator IX antes da injeção no paciente ^[63].

2.4 Expressão de proteínas recombinantes em células animais

Mesmo com todas as dificuldades para o cultivo de células animais que serão discutidas no tópico 2.5, como meio de cultura complexo, fragilidade mecânica, necessidade de desenvolvimento de linhagens contínuas e baixa velocidade de crescimento, a utilização destas permite a síntese de produtos que, por meio de células microbianas, não seria possível ou teria um custo inviável.

Para fins terapêuticos, muitas proteínas precisam sofrer uma série de modificações pós-traducionais que os microorganismos não são capazes de realizar, como glicosilação, fosforilação, sialização, carboxilação, amidação, acetilação, sulfatação e formação de ligações de enxofre ^[14].

O fator IX, glicoproteína de peso molecular de 55000 Da e constituída por 415 aminoácidos de cadeia única, se enquadra nesse caso.

Além disso, como os sinais de transcrição, processamento do RNA mensageiro (RNAm) e tradução são conservados em células superiores, seu gene clonado é facilmente expressado e as proteínas sintetizadas de forma funcional. Também há a vantagem de muitas das proteínas provenientes dessas células serem excretadas para o meio de cultivo, o que facilita sua recuperação e purificação ^[15].

2.4.1 Técnica do DNA recombinante

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de vetor para formar o que se chama de DNA recombinante. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada ^[50].

Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante.

Para obtenção do gene a ser replicado, podem-se utilizar duas técnicas: a do PCR (Polymerase Chain Reaction) e a com o uso de enzimas de restrição, sendo que na segunda técnica é difícil encontrar enzimas de restrição exatamente adequadas.

2.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

A maior aplicação desta metodologia é a possibilidade de se amplificar uma determinada sequência do DNA.. Uma simples cópia de um gene específico dentro de um genoma pode ser amplificado para alguns microgramas, partindo-se de quantidades mínimas como picogramas de DNA total. A condição básica para a aplicação da técnica depende da construção de oligonucleotídeos (iniciadores) os quais são complementares as duas fitas opostas do DNA e que estejam ao lado da sequência a ser amplificada.

O processo inicia-se com a desnaturação da dupla fita do DNA que contém a sequência a ser amplificada.

O passo seguinte permite que os oligonucleotídeos iniciadores anelem-se especificamente nas extremidades ao lado da sequência alvo e nas fitas opostas. Finalmente, como aumento da temperatura a polimerase copia a sequência alvo a partir dos oligonucleotídeos iniciadores é a fase de extensão.

Como mostra a Figura 11, o processo basicamente ocorre em 3 fases: desnaturação, anelamento e extensão, os quais, constituem um ciclo da reação de amplificação.

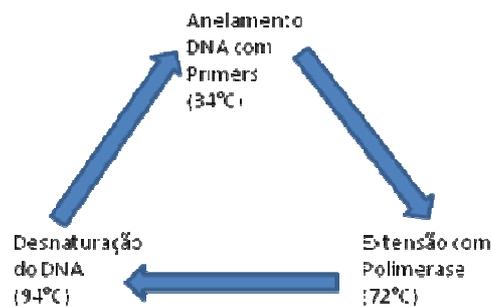


Figura 11. Esquema do Ciclo do PCR.

O processo é cíclico e pode ser repetido varias vezes, dependendo do grau de amplificação que se deseja. O oligonucleotídeo pode ser sintetizado quimicamente, desde que se conheça a sequência a ser amplificada e a partir desta, e sempre adicionada em excesso ao meio reacional. A Figura 12 ilustra a amplificação gênica em uma reação de PCR.

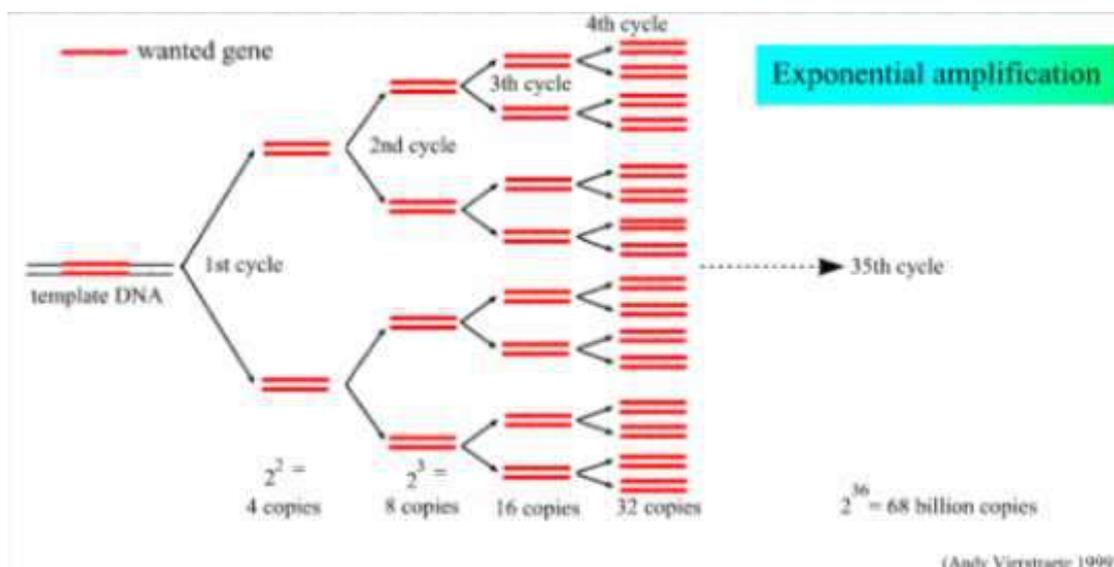


Figura 12. Amplificação do Gene no Processo PCR [50].

2.4.3 Enzimas de Restrição

Cada organismo produz uma enzima de restrição característica, geralmente enzimas de restrição são isoladas de bactérias que as utilizam como um sistema de defesa contra DNAs

estranhos. A digestão de DNA por esta é um processo simples. Colocando-se o DNA em contato com a enzima a uma temperatura ideal (geralmente 37°C) e a enzima inicia o processo de digestão imediatamente, cortando o DNA em fragmentos. O número de fragmentos obtidos é estabelecido pelo número de sítios de restrição reconhecido pela enzima utilizada. A família de fragmentos gerados por digestão com enzima de restrição é geralmente detectada pela separação destes fragmentos por eletroforese em gel de agarose ^[50].

Por causa destas enzimas pode-se cortar um gene de interesse e colocá-lo dentro de outro organismo, como mostrado na Figura 13.

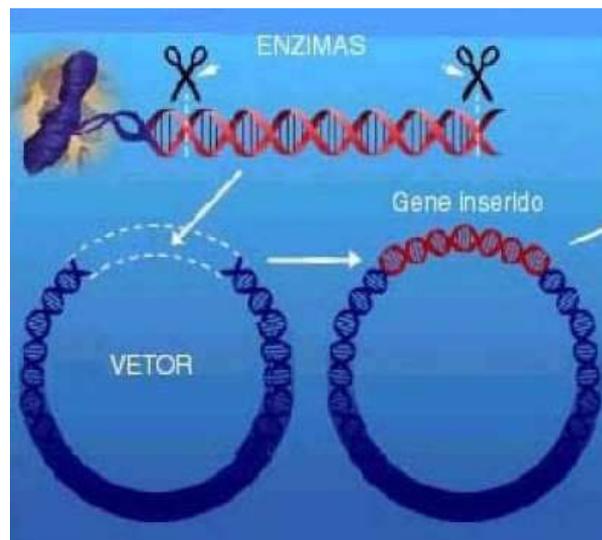


Figura 13. Modo de Ação de uma Enzima de Restrição ^[50].

Esse organismo, após a modificação de seu DNA, passará a produzir a proteína de interesse, para isso é necessário conhecer a seqüência genética desta proteína. No caso do fator IX recombinante ativo, a Tabela 3 mostra sua sequencia do DNA complementar.

Tabela 3 – Sequencia do DNA Complementar para o Fator IX Recombinante Ativo [48].

CAATCTGCTA	GCAAAGGTT	ATQCAGCGG	TGAACATGAT	CATGGCAGAA	TCACCAGGCC	
TGATCACCAT CAACAAAATT GAGAGAGAA CAACTGAAAT TTGCAAGGAT GATGTAACAT TTTGCTCCTG ATGTGGAAGA TATGTAAATT TCACCTCOOT AGTTGATGCA ACTGGTGTAT GAAATGTGAT CCTTCTGGAA TACACGAACA GATCAGCTTT GTTCCACATC AGTGCGGAC AGTGTGCAAT	CTGCCTTTTA CTGAATCGGC GTATGGAGA TTGGAAGCAG GACATTAAAT GTAAACATTA TACTGAGGGA GTTTCTGTTT CTACTGAAGC TGTTGGTGGG TTCTGTGGAG AAATTACAGT TCGAATTATT CTGGACGAAC TCTTCTCAA AGTTCCTCAG TATAACAACA CCCATGTTAC GAAAGGCCAA	GGATATCTAC CAAAGAGGTA AAAGTGTACT TATGTTGATG CCTATGAAATG GAATGGCAGA TATCGACTTG CACAAACTTC TGAACCATT GAAAGATGCCA GCTCTATCGT YGTCCGAGGT CCTCACCACA CCTTAGTGT ATTTGGATCT TACCTTAGAG TGTTCGTGC TGAAGTGGAA TATGGAATAT	TCAGTGGTGA TAATT CAGGT TTTGAAGAAG GAGATCAGTG TTGGTGTCCC TGGGAGCAGT CAGAAAACCA TAAGCTCACC TTGGATAACA AACCAAGGTCA TAATGAAAAA GAACATAATA ACTCACCACA AAACAGCTAC GGCTATGTA TTCCACTGT TGGCTTCCAT GGGACCAGTT ATACCAAGGT	ATOTACAGTT AAATGGGAAG CACGAAGAA TGAGTCCAAT TTTGGATTG TTTGTAAAAA GAAGTCTGT CGTGTGAGA TCACTCAAAG ATTCCTTGG TGGATTGTA TTGSGGAGAC AGCTATTAAT GTTACACCTA GGCTATGTA TGACCAGGCC GAAGGAGGT TCTTAACTGG ATCCCGGTAT	TTTTCTGATC AGTITGTTCA TTTTGAAAAC CCATGTTAA AAGGAAAAGAA TAGTGCTGAT GAACCAAGCAG CTGTTTTTCC CACCCAATCA CAGGTTGTTT CTGCTGCCCA AGAACATACA AAGTACAACC TTTGCATTGC AAGAGTCTTC ACATGCTTTC GAGATTGATG AATTAACCTGG GTCAACTGGA	ATGAAAAACGC AGGSSCCCTT ACTGAAAAGAA ATGGCGGCAG CTGTGAATTA AACAAAGTGG TGCCATITCC TGATGTGGAC TTTAATGACT TGAATGGTAA CTGTGTTGAA GAGCAAAAAGC ATGCAATTGC TGACAAGGAA CACAAAAGGA GATCTACAAA TACAAAGGAT TGGGGTGAAG TTAAGGAAAA
AACAAAGCTC	ACTTAA	TGAAAGATGG	ATTTCCAAGG	TTAATTCATT	GGAAATTGAAA	
ATTAACAGGG TCATTGCTTT ACTAGAGGAA TTAAATTTCTC TCCCTTAGCAG TATACAGTAC CAGGAGTAGC TTACCTTTTC TCCATGGTAG TCAAACCCAG AAGTTTGGGG AATATACAAT ATGGAAGCAA GCAAGATTGG ATAATAATA BAAGAATTCA GACATAAGTA TAAGTCATTC TAGTTAATCC TAATAAAGCTG	CCTCTCACTA TTCTCTTTAC TATAATGTGT CACTCTGTCC CATTCCATCT AGGATCTTTG TGAGAGGCTA CAAATGCCA TTAAAGGAGA ACTTGCCTCC GAAAAGTTTC ATAAATATAT TAAGCCATT CATATCAGTT TAATGCTAAC ACAAGTGTGC TCAITGCTCC CAATCAGCCA TTCTATCTTG GTGTTCTGGT	ACTAATCACT AGGGGAGAAT TAGGAAATTA ATCAGATACT TCCCGATCTT GTCTACTCTA AAACTCATCA ATTCGCCAAA GATGGGAGC ATAGTGGAGA TTTCAGAGAG AGTGTGTGTG TTAAGAGCTT GTAAGTAAAA AGAAAGAAGA TTCAGCAGTG TTTAACTAGC ACTAAGTTGT AATCTCTAG TCAAAAAAAA	TTCCCATCTT TTCATATTTT CAGTCATTT ATGGTTCCTC CCTTGCCTTC TCACGAGAAG AAAACACTAC TCAGTTTTTC ATCATTCTGT CTTGGCTTTT TTAAGTTAT TGTATGGCTG GATGCTTAT AAGCTGACAT GAACCGTTCC TTCAGAGCCA ATACCCGAA CCTTTTCTGG AGAGTTGCTG AA	TTGTTAGATT ACCTGAGCAA TGAAGCCAG ACTATGGCAA CCAACCAAAA GCTCAGTACC TCCTTTCTBT TCTTTCTTAC TATACTCTGT AGAAACATAGG TTATATATAT TGTGTAGACA GGAGGTCTGA TGACCAGAC TTTGAATCT AGCAAGAAGT GTGGAGAAGG TTTCTGTTC ACCAACTGAC	TGAATATATA ATTGATTAGA TGAAGCCAA CTAACTCACT CATCATGTTT ACAGTCTGGA TCAGCCTATT TCCCTCTCTC TACACAGTTA GATGAAGTAA AATATATATA CACAGGCATA CTAGCCTGGA ATATTGTA ACAGCAATGA TGAAGTTGCC ATGCAGCAGG ACCATGGAAC GTATGTTCC	CATTCTATGA AAATGGAACC AATTGTGAAG CAATTTTCCC ATTAGTTCTG AGAAAAGACA CCTCAATCTT CCTTTTACCC TGCATGCTA GGTGCCTGAA TAAAATATA CAGCATATA TTTCAGGAAG CCTTCTAAAA GAGACTTGAG TAGACCAGAG CTCAAGGCA ATTTTGATTA CTTTGTGAAT

A ligação do gene com o plasmídeo é efetuada pela enzima DNA ligase. Esta enzima promove a ligação dos fragmentos de DNA em vetores previamente clivados por endonucleases de restrição.

A Figura 14 mostra uma molécula de DNA de plasmídeo que tem somente um sítio de clivagem para uma determinada enzima de restrição. A mesma enzima é usada para clivar DNA humano. Se os fragmentos de DNA humano são misturados com o DNA plasmidial linearizado, permitindo a ligação entre eles, uma molécula de DNA plasmidial contendo DNA humano pode ser gerada. Este plasmídeo híbrido pode ser inserido em uma bactéria por transformação e replicado, conseqüentemente replicando o gene inserido.

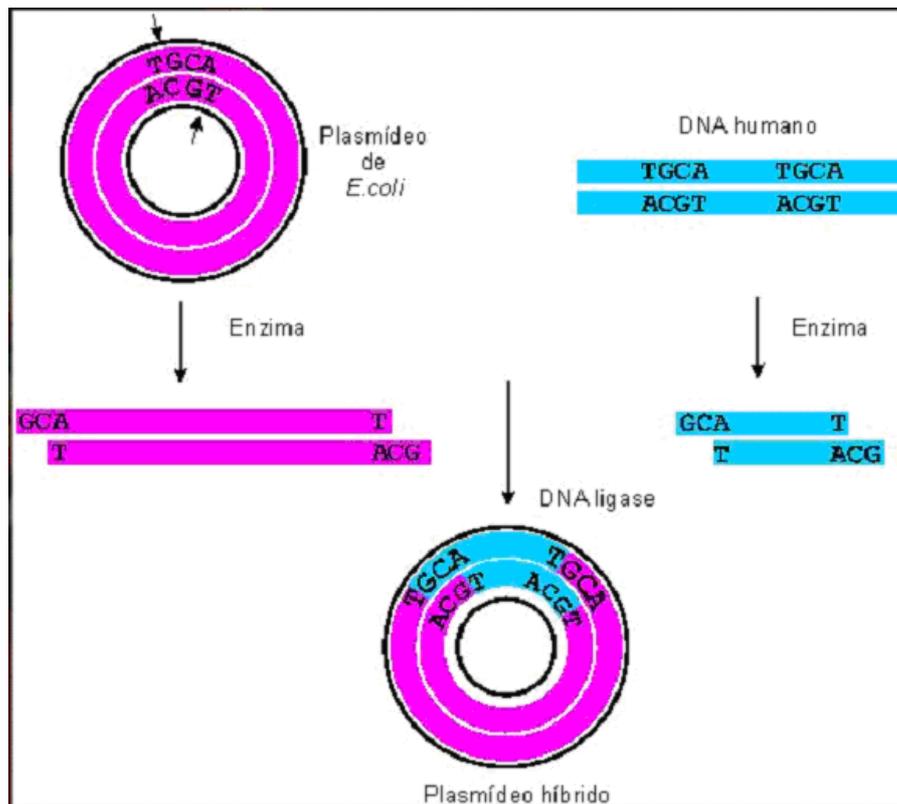


Figura 14. Molécula de DNA de Plasmídeo com somente um Sítio de Clivagem ^[50].

2.4.4 Clonagem

Após o isolamento de uma informação genética este fragmento deve ser inserido em uma em um vetor, capaz de amplificar aquela informação em centenas de cópias. Atualmente, os tipos básicos de vetores usados na metodologia do DNA recombinante apresentam características especiais que os tornam bons veículos de clonagem em diferentes situações.

2.4.4.1 Plasmídeos

Os principais vetores utilizados são os plasmídeos. Eles são mais usados para a clonagem de pequenos fragmentos de DNA, são geralmente obtidos através de bactérias, facilmente reintroduzidos nestas células e possuem capacidade autônoma de replicação, como apresentado na Figura 15

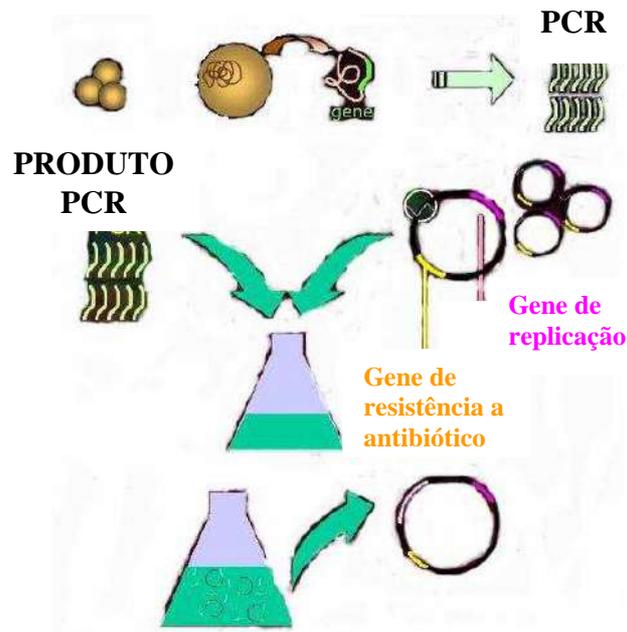


Figura 15 Modo de Replicação de Genes Utilizando Plasmídeos ^[50].

2.4.5 Transferência de Genes

Após a ligação do gene ao vetor de expressão, este é inserido na célula hospedeira. Dois métodos distintos podem ser utilizados na transferência de genes para células animais: a transfecção (transferência direta do DNA por métodos físicos, químicos ou biológicos) e a infecção (transferência mediada por infecção com um vírus que contém um gene específico integrado ao seu genoma).

No caso da produção de Fator IX recombinante o vetor de clonagem utilizado é plasmidial e o método de transferência do plasmídeo para a célula hospedeira é o de transfecção. O plasmídeo ou parte dele pode se mover para dentro do núcleo da célula hospedeira e se “recombinar” com o DNA da mesma, como mostra a Figura 16.

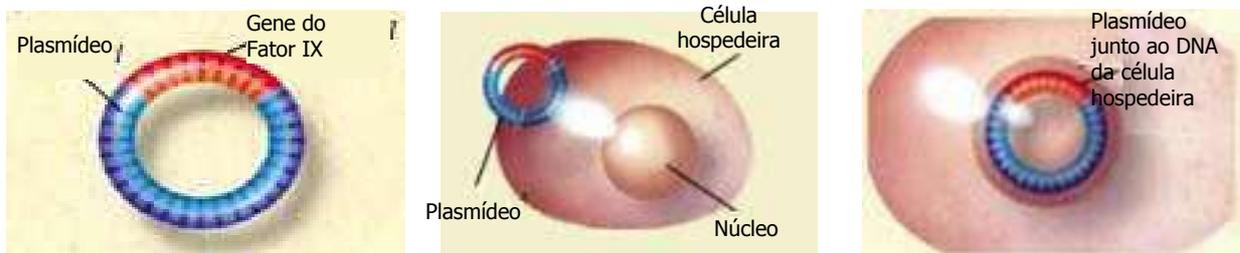


Figura 16. Método de transferência de genes através da Transfecção ^[15].

2.5 Cultivo de Células Animais

A engenharia bioquímica tem por tradição o cultivo de microorganismos, que é bastante distinto do cultivo de células animais.

As células animais são diferenciadas, cada uma exercendo uma função distinta no organismo. Em sua fase embrionária, essas células passam por diversas transformações, o que torna as células adultas diferenciadas para exercer uma função, fazendo parte de um tecido ou órgão. Mesmo sendo todas da mesma espécie e conterem o mesmo material genético, cada célula é responsável por sintetizar diferentes compostos, que podem ser utilizados por diferentes células.

Sendo assim ocorre interdependência entre as células, o que acarreta uma série de limitações que não são encontradas em cultivos de microorganismos. Como uma célula cresce em um organismo que lhe provê todos os nutrientes necessários a seu crescimento e sobrevivência, para o crescimento de células animais *in vitro* (em biorreator), o meio de cultura deve ser extremamente complexo devendo conter todos os aminoácidos, vários sais minerais, vitaminas, ácidos graxos e fontes de carbono, como glicose e glutamina.

O meio de cultivo, além de conter os nutrientes que serão metabolizados pelas células, também deve conter compostos inorgânicos, que ajustem a osmolalidade, promovam tamponamento e promovam forças iônicas adequadas.

Em relação ao estresse sofrido pelas células em um biorretator, as células animais são muito mais frágeis que as células microbianas, que apresentam membrana celular rígida^[11]. Dessa maneira, a agitação deve ser bem menor do que a típica para cultivo microbiano, pois esta inibiria o crescimento das células animais por quebra de sua parede celular.

No caso do crescimento de células suspensas em reatores agitados e aerados por aspersão, em 1991, Papoutsakis determinou que o maior dano se deve à quebra das bolhas de ar na superfície do líquido e à velocidade de drenagem do filme líquido em torno da interface gás-líquido. O uso de sistemas com areação sem a formação de bolhas seria uma forma de evitar esse prejuízo às células.

Por sua biologia, células animais necessitam sofrer transformações para serem utilizadas em processos industriais. Diferentemente dos microorganismos, que se reproduzem ilimitadamente, células primárias provenientes de tecidos podem ser sub-cultivadas por um número finito de divisões (em torno de 50)^[12], passando a ser células normais. Após o período de divisões, elas entram em processo de envelhecimento e morte programada.

Através de processos espontâneos ou carcinogênese, algumas células podem perder a limitação do número de divisões, originando células transformadas ou linhagens contínuas, que

são as utilizadas nos processos biotecnológicos. As linhagens mais comuns são *Baby Hamster Kidney* (BHK), *Chinese Hamster Ovary* (CHO), Vero e hibridomas ^[13], sendo as que as duas primeiras podem ser utilizadas na síntese de rFIX.

No que diz respeito à velocidade de crescimento de células animais, mesmo em condições otimizadas, esta é considerada baixa quando comparada à dos microorganismos e está entre 0,001 e 0,05 h⁻¹.

2.5.1 Processos de Cultivo Celular

Há vários tipos de biorreatores para processos com células animais. A primeira classificação se deve ao fato de as células estarem suspensas ou imobilizadas

Células animais aderentes são dependentes de suporte físico para seu crescimento, como microcarregadores, garrafas “Roller” e fibras ocas ^[16].

Para as que podem ser cultivadas em suspensão, podem ser usados biorreatores tipo tanque agitado e biorreatores tipo coluna de bolha (*air lift*).

Quanto ao modo de operação do cultivo, este pode ser em batelada, batelada alimentada, contínuo ou em perfusão, ilustrados na Figura 17.

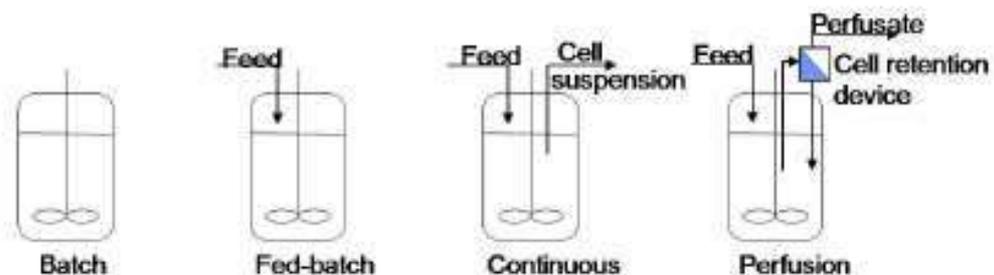


Figura 17. Modos de Operação para Cultivo de Células Animais. ^[17]

Os modos de operação da Figura 17 diferem basicamente na forma como o fornecimento de nutrientes e a remoção de metabólitos são realizados, sendo que esses são fatores que determinam a concentração de células, nutrientes e produtos, e a produtividade volumétrica que pode ser alcançada. Para esses modos de operação, a o gráfico da Figura 18 mostra a produtividade volumétrica ao longo do tempo.

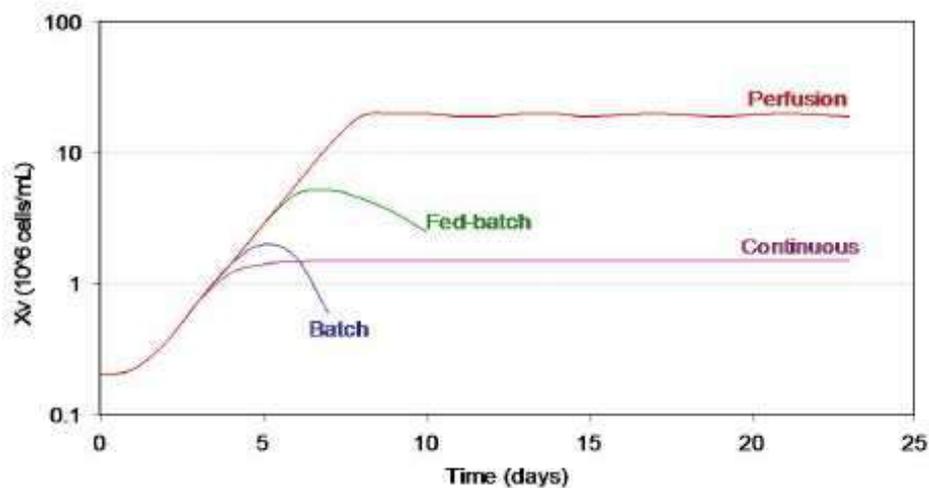


Figura 18. Produtividade Volumétrica de Células Animais ao longo do Tempo. ^[17]

Pela análise da Figura 18, os processos de batelada e batelada alimentada são os que apresentam menor produtividade volumétrica de células e o processo em perfusão apresenta a maior produtividade. Perfusão são processos contínuos que possuem algum tipo de separação das células retiradas junto com o meio de cultivo. Essas células são separadas e recirculadas para o biorreator, o que aumenta a concentração de células neste.

Sua maior produtividade se deve ao fato de que, como células animais crescem em velocidade muito baixa, muitas vezes secretam produto mesmo sem estarem em fase de crescimento, sendo boa a manutenção do maior número possível de células produtoras.

A operação em batelada é limitada por expor as células a constantes mudanças, com progressiva redução da concentração de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos pelas próprias células. Já a batelada alimentada, há uma estratégia especial de alimentação de meio de cultivo, o que prolonga a cultura e aumenta a produtividade de células, que chega, em curto tempo, a ser maior do que a produtividade da operação contínua, onde os nutrientes são continuamente alimentados ao biorreator e a mesma quantidade de meio de cultivo é retirada.

Dessa maneira, cultivos em perfusão apresentam a maior eficiência, justamente por apresentar separação e recirculação de células, o que torna essa etapa essencial para a boa produtividade desse tipo de cultivo.

2.5.2 Equipamentos para retenção celular em cultivos em perfusão

Como o cultivo celular em perfusão é o que apresenta maior eficiência, serão detalhados dispositivos que podem ser usados para separação de células e recirculação ao biorreator para que seja possível a escolha do dispositivo que mais se ajusta às necessidades do cultivo.

Os equipamentos para retenção de células podem ser instalados dentro ou fora do biorreator, conectados a ele para promover a recirculação das células. Quando a instalação é interna, a operação é mais simples e segura, mas a instalação externa permite que a operação e os fatores de ampliação de escala sejam independentes da operação do biorreator. Além disso, na instalação externa, em caso de pane no equipamento, este pode ser substituído sem que o cultivo celular tenha que ser interrompido. ^[18]

2.5.2.1 Centrífugas

Existem duas famílias de centrífugas, as decantadoras e as filtrantes. A primeira família tem como princípio a força centrífuga para mover as partículas radialmente, seja para o centro ou para as paredes da centrífuga, dependendo se forem mais pesadas ou leves que o líquido em que se encontram. Se forem mais densas, elas se movem em direção à parede. Então o princípio de separação desse tipo de centrífuga é a sedimentação em um campo centrífugo.

A segunda família, também conhecida como filtros centrífugos, usam o campo centrífugo para promover a pressão necessária para forçar o líquido através do meio filtrante e da torta de filtração.

As centrífugas são bastante eficientes na separação de células do meio de cultivo, mas apresentam complexidade mecânica e as células podem sofrer altos efeitos de cisalhamento, que são função do tipo de célula ^[19] e ao passar do tempo se acumularam nos canais e discos de separação, causando entupimento na centrífuga e diminuindo a eficiência de retenção de células ^[20].

2.5.2.2 Hidrociclones

O hidrociclone é um equipamento bem simples, como ilustra a Figura 19. Ele é constituído por uma seção cônica acoplada a uma porção cilíndrica, que é iniciada com uma entrada tangencial e fechada por um prato com duto axial de *overflow*. O final do cone é uma abertura circular, chamada de orifício de *underflow*.

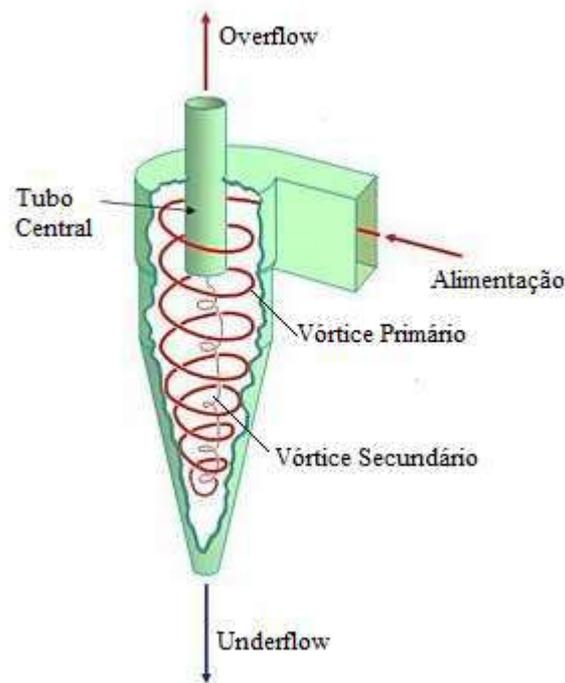


Figura 19. Perspectiva de um Hidrociclone com Linhas de Fluxo Internas. ^[32]

Usam o princípio de separação de sedimentação em um campo centrífugo, assim como as centrífugas, mas não possuem partes móveis e o movimento de vórtice é realizado pelo próprio fluido.

A corrente de alimentação é introduzida tangencialmente no duto de entrada na parte superior da seção cilíndrica, adquirindo um forte movimento para baixo em vórtice. Como o orifício de underflow é pequeno para permitir uma descarga completa, sendo que somente parte do líquido escapa pelo underflow carregando as partículas grossas. A outra parte do líquido reverte seu escoamento na direção vertical e sobe em um movimento de vórtice ainda mais forte e sai pelo duto de overflow carregando as partículas mais finas.

Além disso, como as células têm um tempo de residência pequeno, em torno de 0,03 a 1 segundo no hidrociclone, as células resistem bem à tensão de cisalhamento relativamente elevada gerada por este, não havendo nenhuma mudança significativa na viabilidade celular quando o hidrociclone opera com queda de pressão até 300 KPa. ^[22]

Os hidrociclones podem ser facilmente projetados para promover a separação desejada e sua performance também pode ser facilmente estimada. Por não ter partes móveis, se encaixam em operação sob condições assépticas requeridas pela indústria de biotecnologia e também não requerem manutenção, o que evita riscos adicionais de contaminação e permite operação contínua por longo período de tempo, sendo um interessante equipamento para ser utilizado na separação de células de processos em perfusão.

2.5.2.3 Sedimentadores Gravitacionais

Assim como nos campos centrífugos, a separação por gravidade ocorrerá somente se existir diferença de densidade entre as células animais e o líquido. No entanto, essa diferença geralmente é pequena. Por sua vez, o tamanho das células é relativamente pequeno. Esses dois fatores explicam o fato de as células apresentarem velocidade terminal baixa em um campo gravitacional, o que faz com que a área para separação seja muito elevada. Isso dificulta a separação de células em sedimentadores.

Sedimentadores com lamelas, que são placas planas inclinadas posicionadas bem próximas, são bem mais compactos em relação aos sedimentadores verticais. No entanto, as células tendem a aderir às lamelas, sendo necessários revestimento especial e vibração de todo o conjunto para amenizar o problema.

Comparados à filtração e a centrifugação, os sedimentadores gravitacionais evitam problemas de entupimento e danos às células causados por alta tensão de cisalhamento. No entanto, os longos tempos de residência para efetuar a separação gravitacional devido à baixa velocidade terminal das células são preocupantes, pois o interior do sedimentador é um meio não oxigenado e sem mistura.

2.5.2.4 Filtros de Malha Rotativa

Os filtros de malha rotativa (*spin filters*) são cilindros com uma parede porosa, montados no interior de biorreatores agitados, posicionados no eixo do agitador ou acionados por um motor independente. O perfundido é bombeado do interior da malha rotativa para fora do biorreator à mesma taxa com que o meio de cultura é bombeado para o interior do biorreator, como ilustra a Figura 20.

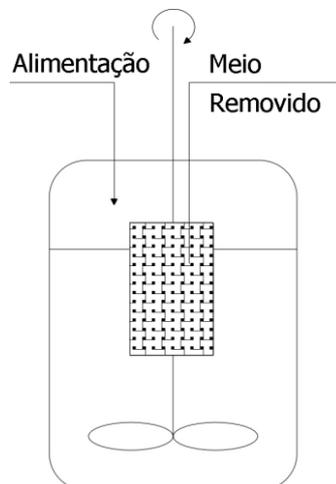


Figura 20. Perspectiva de Filtro de Malha Rotativa Montado no Eixo do Agitador de um Biorreator. ^[18]

Desde o trabalho pioneiro de Himmelfarb et al. ^[23], muitos estudos foram publicados investigando os efeitos da velocidade de rotação, taxa de perfusão, material filtrante e concentração celular na performance – eficiência de separação e ocorrência ou não de entupimento progressivo na malha – dos filtros de malha rotativa em cultivos em perfusão.

Nesse tipo de filtro atuam várias forças tanto no líquido quanto nas células, como força gravitacional, força axial devido ao agitador, força centrífuga gerada pela rotação do filtro e força de arraste gerada pelo fluxo de perfusão.

Danos à malha do filtro são preocupantes, uma vez que um processo de perfusão ideal deve operar continuamente por um longo período de tempo. Como a troca de peças internas durante o processo de perfusão é impossível, o filtro de malha rotativa deve ser projetado e operado de modo a evitar entupimentos e impedir interrupção prematura do cultivo celular.

Embora um grande progresso tenha sido obtido na última década no que diz respeito à operação, projeto e ampliação de escala de filtros de malha rotativa, em muitos trabalhos da literatura são observados problemas de danos e entupimento da malha.

2.5.2.5 Filtração Tangencial

Em sistemas de filtração com escoamento tangencial, a solução alimentada esco perpendicularmente à direção de permeação. O escoamento tangencial gera alta tensão de cisalhamento na superfície do filtro, que contribui para evitar entupimento do filtro, permitindo operação contínua e alto fluxo de filtrado.

Esse tipo de filtração tem como vantagens a simplicidade do processo e fácil adaptação ao biorreator tanque agitado disponível ^[24]; alta capacidade de filtração com completa retenção celular, gerando um filtrado livre de partículas ^[25]; operação externa, que possibilita a troca asséptica do filtro se ocorrer entupimento, não impede a ampliação de escala do biorreator como ocorre com os equipamentos de separação instalados dentro deste ^[26]; baixos custos de operação e possibilidade de uso do mesmo processo para uma grande variedade de produtos sem grande trabalho adicional para adaptação ^[27].

No entanto, o fluxo de alimentação tangencial é limitado pela sensibilidade das células à tensão de cisalhamento, o que limita sua ação de limpeza, sendo o entupimento progressivo das membranas do filtro a maior preocupação em relação ao seu desempenho.

2.5.2.6 Filtração Dinâmica

A filtração dinâmica é baseada na criação de um movimento relativo entre a membrana e seu suporte ou entre a membrana e um rotor para que a tensão de cisalhamento produzida por esse movimento seja independente da taxa de alimentação.

Estão disponíveis dois tipos de filtros com geometrias distintas: filtros de cilindro rotativo (VFF) e filtros de disco rotatório (RDF).

O filtro VFF consiste em um cilindro fixo dentro do qual um cilindro concêntrico gira. O movimento rotatório origina vórtices de Taylor, que geram mistura induzida perpendicularmente à superfície da membrana, reduzindo o entupimento desta. Dessa maneira não são necessárias altas taxas de alimentação para evitar esse entupimento.

O filtro RDF consiste em um disco rotatório posicionado no interior de um suporte fixo, com as membranas montadas no disco rotatório ou no interior do suporte. Também é possível ajustar a tensão cisalhante, queda de pressão através da membrana e tempo de residência de forma independente da corrente de entrada, o que otimiza o processo de filtração e possibilita controle do campo cisalhante. Esse tipo de filtro tem se mostrado muito eficiente não somente para suspensões microbianas, mas também para suspensões com células de mamíferos ^[28, 29].

Castilho et al. ^[30] usaram uma ferramenta computacional de fluidodinâmica (CFD) combinada com um projeto estatístico para otimizar a geometria do rotor e a velocidade angular de um filtro RDF destinado à separação de células de mamíferos. A estratégia e as ferramentas utilizadas nesse trabalho possibilitaram a determinação de uma geometria otimizada que minimiza problemas de entupimento por gerar altas forças cisalhantes na superfície da membrana enquanto há o controle a tensão cisalhante máxima global em todo o módulo em um certo nível de modo a não danificar as células. Os autores propuseram o uso desse filtro com membranas de afinidade para permitir um processo integrado em um estágio de perfusão/purificação para produção de proteínas recombinantes a partir de células de mamíferos, o que poderia resultar em redução dos custos de produção. Isso indica que esse tipo de filtro é um equipamento promissor para a separação de células para o processo de cultivo celular em perfusão, embora ainda não tenha sido relatado seu uso para esse fim. O filtro proposto está esquematizado na Figura 21.

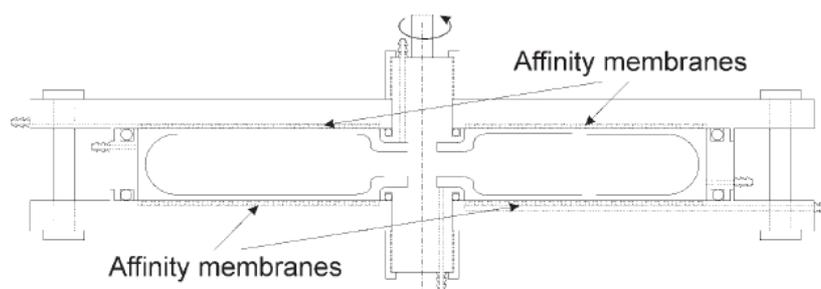


Figura 21. Filtro RDF projetando usando CFD. ^[30]

2.5.2.7 Separação Ultrassônica

A separação ultrassônica de células ocorre devido a forças acústicas geradas em uma onda estacionária plana. Essas forças são resultantes de interações entre o fluido e as células e sua magnitude é função das diferenças de densidade compressibilidade entre as células e o meio ^[31]. Uma onda estacionária plana cresce como resultado de interferência entre ondas com mesmo comprimento de onda e amplitude que deslocam em direções opostas. Ela é formada pelo plano nodal estacionário e planos antinodais. Os planos nodais são separados entre si por metade do comprimento de onda e os planos antinodais ficam equidistantes entre eles. Os nós de velocidade e pressão são coincidentes.

As forças ultrassônicas primeiro levam as células em direção aos nós de pressão do campo de ressonância. As células então migram lateralmente dentro dos nós, formando aglomerados de células. A eficiência de separação depende da magnitude das forças desenvolvidas dentro do equipamento e essas forças são função da distribuição de densidade de energia no líquido.

Separadores ultrassônicos já foram usados para separação de microorganismos e células animais em processos de perfusão, no entanto, as altas amplitudes necessárias para promover essa separação geram um aumento local de temperatura, o que pode ser um sério problema no que diz respeito ao lidar com células e com produtos sensíveis à temperatura.

2.5.2.8 Separação Dieletrorética

O princípio dessa separação é o movimento de uma partícula neutra a ser submetida a um campo elétrico não-uniforme, conhecido como fenômeno de dieletrforese.

Uma partícula (célula) imersa em um campo elétrico fica polarizada por um momento de dipolo induzido. Para campos não-uniformes, o campo em uma região da célula será mais intenso que em outras regiões, o que contribui para o aumento das densidades de carga em áreas

relativamente específicas da célula. Dessa maneira, a partícula experimenta uma força translacional, que pode aproximá-la ou afastá-la das regiões de alta intensidade do campo região do campo elétrico. A força dieletroforética é função das propriedades dielétricas da célula em relação ao meio de cultivo, da frequência e do nível de não-uniformidade do campo elétrico aplicado ^[43].

Embora esse tipo de separação venha sendo utilizado para a separação de microrganismos, células de plantas e células animais, somente recentemente vem sendo cogitada sua aplicação em sistemas de perfusão. Um problema dessa separação é o possível aquecimento do meio dentro do filtro, o que pode diminuir a viabilidade das células ^[18].

A Figura 22 ilustra a ação dieletroforética de um campo elétrico não uniforme em uma partícula, movendo-a em direção às regiões de alta intensidade do campo elétrico.

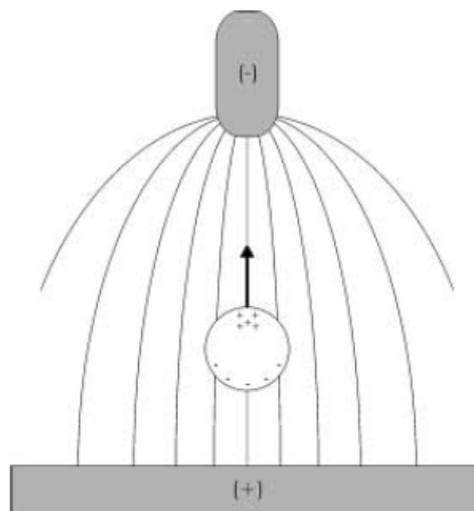


Figura 22. Ação Dieletroforética de um Campo Elétrico não Uniforme em uma Partícula ^[18].

Entre os dispositivos de retenção celular apresentador, o hidrociclone é uma excelente escolha, por este ser externo ao biorreator, o que permite que a operação e os fatores de ampliação de escala sejam independentes da operação do biorreator, e possibilita sua substituição em caso de pane sem interromper o cultivo celular.

Além disso, é um equipamento simples que pode ser facilmente projetado para promover a separação desejada e cuja performance pode ser facilmente estimada. Por não ter partes móveis, opera sob condições assépticas requeridas pela indústria de biotecnologia e também não requer manutenção, o que evita riscos adicionais de contaminação, permitindo operação contínua por longo período de tempo.

2.6 Processos de Purificação

Após a produção da proteína de interesse pelo cultivo celular, ela precisa ser purificada, principalmente se for uma proteína terapêutica para uso em seres humanos, que é o caso do fator IX, pois, para biofármacos, o nível de pureza é muito elevado. Para tal, são necessárias sequências de purificações, sendo as técnicas de cromatografia amplamente utilizadas, pois estas se baseiam em diferentes princípios de separação, gerando combinações altamente poderosas para a purificação de qualquer biomolécula ^[36].

Aliados à cromatografia, podem ser utilizados de separação por membranas. Ao longo dos últimos 30 anos, as membranas começaram a ser utilizadas em vários processos industriais como agentes de separação de componentes ^[39]. Sua aplicabilidade tem se ampliado com o tempo e atualmente os processos de separação por membranas são utilizados em áreas bastante distintas, inclusive na separação de proteínas.

É importante ressaltar que métodos para purificação de fatores obtidos pela técnica de DNA recombinante diferem dos utilizados para purificar fatores obtidos por fracionamento do plasma devido ao fato de o processo de obtenção e também o meio em que os fatores se encontram serem bastante distintos. No caso do fator IX obtido do plasma, a separação consiste principalmente em isolar o fator de proteínas presentes no plasma, incluindo outros fatores de coagulação sanguínea. Na purificação do fator IX recombinante, como são necessárias mudanças pós-traducionais para sua síntese, somente uma parte do fator IX excretado pelas células é ativo. Dessa maneira, como o fator IX ativo é muito semelhante às formas inativas, para isolá-lo delas, são utilizados princípios que explorem suas diferenças conformacionais. O isolamento da forma ativa do fator IX é fundamental, uma vez que, se formas inativas forem parar na corrente sanguínea, o seu efeito é desconhecido e se elas forem contabilizadas como ativas na formulação do fármaco, o hemofílico estará ingerindo uma dose de fator IX menor do que a especificada. Também há a preocupação com a separação de outras proteínas que tenham sido excretadas pelas células junto com o fator IX.

2.6.1 Cromatografia

A cromatografia pode ser definida como uma técnica de fracionamento de substâncias baseada nas diferentes velocidades com que cada uma delas se move através de um meio poroso (fase estacionária) ao serem arrastadas por um solvente em movimento (fase móvel). A velocidade de migração de um soluto em uma fase móvel pode envolver fenômenos de partição, adsorção,

troca iônica e exclusão. Para a purificação de uma determinada substância, esta pode ser retida na fase estacionária, ou então podem ficar retidas suas impurezas.

No caso da separação de diferentes proteínas, a Figura 23 esquematiza uma coluna cromatográfica genérica.

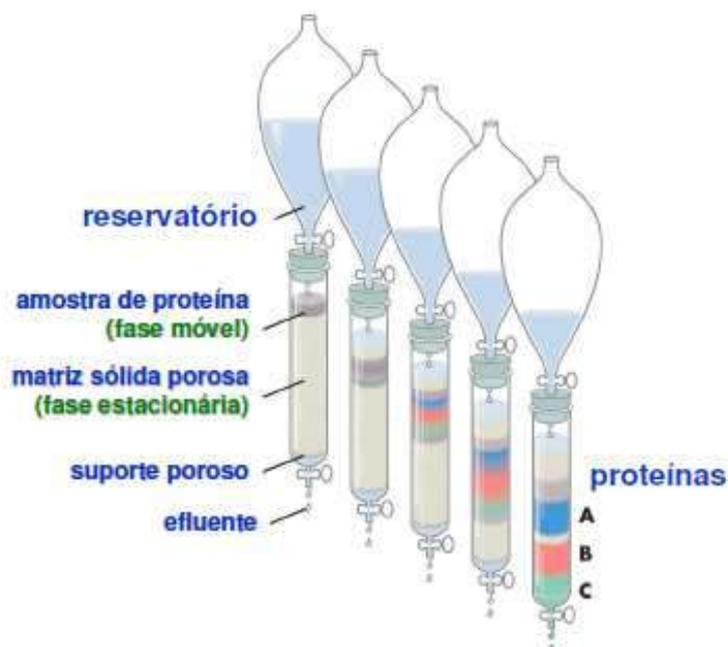


Figura 23. Esquema Geral de uma Coluna Cromatográfica. ^[37]

2.6.1.1 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica é uma técnica de fracionamento baseado na fixação de substâncias dotadas de cargas a um suporte (fase estacionária) que contém uma carga oposta. A separação é possível uma vez que as interações eletrostáticas entre os grupamentos são reversíveis e dependentes da afinidade de cada substância pelo suporte. Essa afinidade é função do pH do meio, temperatura e força iônica do tampão.

Os suportes, também conhecidos como trocadores iônicos ou resinas, são normalmente colocados em colunas. Estes podem ser classificados como catiônicos ou aniônicos. Os suportes catiônicos possuem grupamentos ácidos e são utilizados para fixar substâncias com cargas positivas, enquanto os suportes aniônicos possuem grupamentos básicos e são utilizados para fixar substâncias com cargas negativas.

As resinas são obtidas pela introdução de grupos polares em matrizes insolúveis em água, sendo conhecidas pelo nome comercialmente usado para a venda no mercado.

Quando as substâncias a serem separadas são proteínas, que possuem tanto cargas negativas quanto positivas e cuja carga líquida é função do pH do meio, o fator principal para a escolha da resina adequada é a estabilidade da proteína em diferentes pH's. Se a proteína for estável acima de seu ponto isoelétrico (PI), escolhe-se uma resina aniônica e se ela for estável abaixo de seu PI, uma resina catiônica.

Para eluição seqüencial das substâncias fixadas, é provocada por mudança de pH ou força iônica do meio através de gradiente contínuo ou em sistema seqüencial para que estas eluam em forma seqüencial e sejam coletadas purificadas.

A Figura 24 mostra o esquema de uma cromatografia de troca iônica.

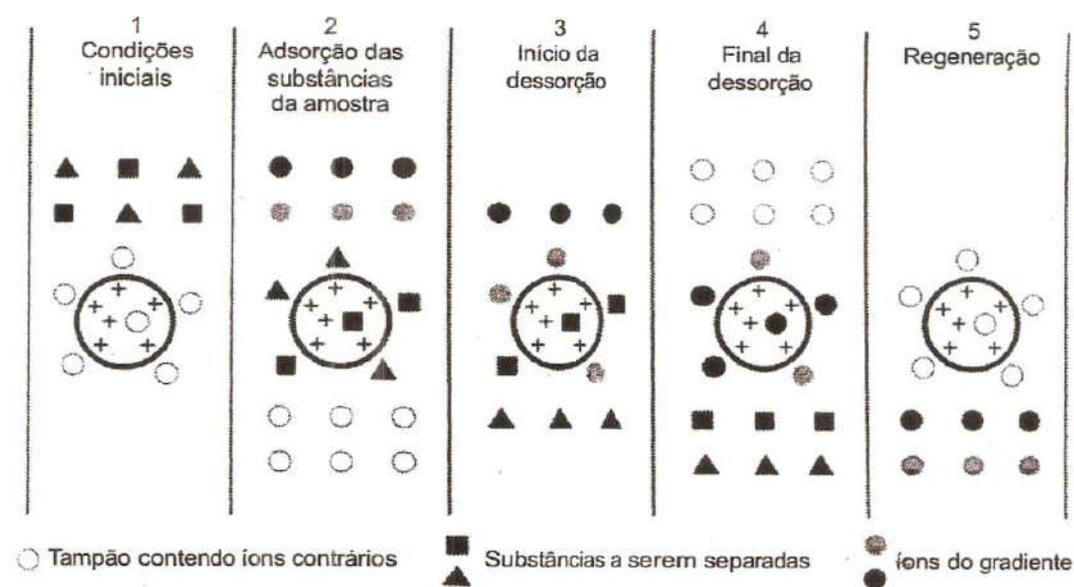


Figura 24. Esquema de Cromatografia de Troca Iônica. ^[38]

Para proteínas, a separação deve ser feita de forma rápida para evitar sua desnaturação.

No caso do fator IX proveniente de plasma sanguíneo e recombinante, a cromatografia de troca iônica é bastante utilizada.

2.6.1.2 Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade é um tipo especial de cromatografia de adsorção realizada em coluna empacotada com partículas porosas contendo ligantes específicos das moléculas de interesse. A solução contendo essas moléculas passa através da coluna e estas ficam ligadas à fase estacionária, enquanto suas impurezas correm com a fase móvel.

Quando os ligantes específicos são anticorpos monoclonais, que têm a capacidade de identificar e se ligar a uma proteína específica como um sistema “chave-fechadura”, essa técnica é denominada de cromatografia de imunoafinidade.

Para separação de proteínas, também podem ser utilizados íons de metais de transição imobilizados, como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} , pelos quais elas tenham afinidade, sendo essa técnica denominada de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC).

A cromatografia de afinidade ou suas variações são muito utilizadas na separação do fator IX recombinante ou obtido por fracionamento de plasma sanguíneo.

Essa técnica está ilustrada na Figura 25.



Figura 25. Esquema de Cromatografia de Afinidade. ^[37]

2.6.1.3 Cromatografia de Exclusão ou Filtração em Gel

Esse tipo de cromatografia tem como princípio de separação a diferença de tamanho molecular das substâncias a serem separadas. É realizada em uma coluna recheada com material inerte cujo tamanho dos poros é controlado. As moléculas menores do que os poros penetram nestes, apresentando maior tempo de retenção na coluna, enquanto as moléculas maiores são excluídas dos poros. Dessa maneira, as moléculas grandes se movem rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel.

A Figura 26 esquematiza uma cromatografia de exclusão.

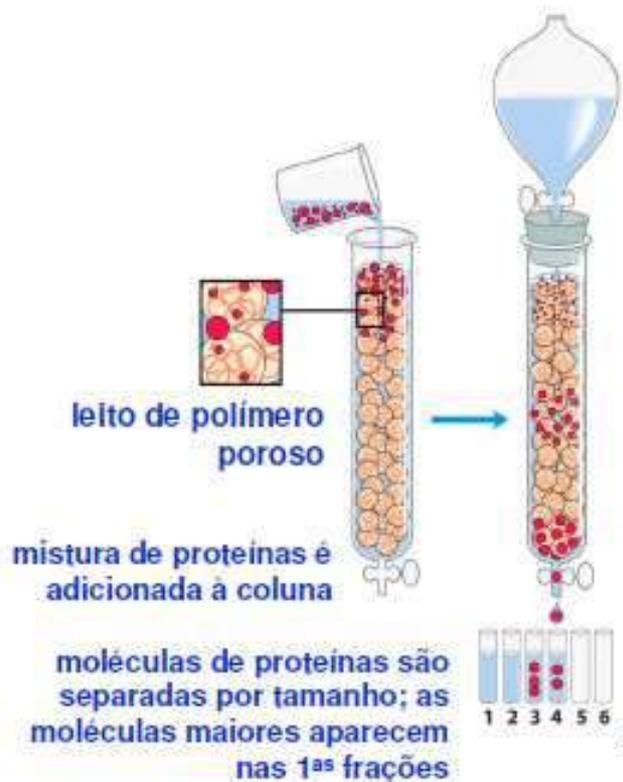


Figura 26. Esquema de Cromatografia de Exclusão. ^[37]

No caso da purificação do fator IX, esta técnica não é muito utilizada, pois as impurezas a serem separadas apresentam peso molecular muito próximo ao do fator, principalmente no caso do fator IX recombinante, em que as impurezas de mais difícil separação são suas formas inativas.

2.6.2 Processos de Separação por Membranas

Nos sistemas de separação por membrana, o fluido contendo os componentes a serem separados é colocado em contato com uma membrana que permite a passagem seletiva de alguns componentes mais rápida do que de outros. A natureza física e química das membranas, como o tamanho do poro e sua distribuição de tamanhos, afetam diretamente a separação ^[40].

Os processos da tecnologia de membrana, divididos em osmose inversa (OI), ultrafiltração (UF), microfiltração (MF), nanofiltração (NF) e diálise (D) oferecem vantagens na recuperação de bioprodutos. Tais vantagens, segundo FANE e RADOVICH ^[41], envolvem a facilidade no escalonamento dos equipamentos, elevada estabilidade, o processo ocorre em temperaturas moderadas, sendo assim adequados para a separação de produtos termolábeis, o estresse químico

e físico pode ser minimizado, economia de energia, seletividade, além de permitir que a concentração e a purificação possam ser obtidas em uma única etapa ^[40].

Os processos que utilizam membranas porosas têm sua seletividade diretamente relacionada ao tamanho dos poros e às espécies químicas presentes no meio a ser filtrado. Além disso, essas espécies devem ser, na medida do possível, inertes em relação ao material que constitui a membrana. Nas membranas porosas o transporte das espécies pode ser tanto convectivo quanto difusivo, dependendo da força motriz aplicada. Para MF, UF e NF a força motriz é o gradiente de pressão através da membrana, sendo o fluxo permeado fundamentalmente convectivo. No caso da diálise, a força motriz é o gradiente de concentração das espécies através da membrana e o fluxo permeado é de natureza difusiva. Nesse caso as espécies se difundem no meio em que se encontram através dos poros da membrana.

As Tabelas 4 e 5 resumem os processos de separação por membranas:

Tabela 4 - Processos de separação com membranas comerciais ^[42].

Processo	Material Retido	Material que Permeia
Microfiltração (MF)	Material em suspensão, bactérias Massa molar > 500 k Da (0,01 µm)	Água e sólidos dissolvidos
Ultrafiltração (UF)	Colóides, macromoléculas Massa molar > 5000 Da	Água (solvente), sais solúveis de baixa massa molar
Nanofiltração (NF)	Moléculas de massa molar média entre 500 < MM < 2000 Da	Água, sais e moléculas de baixa massa molar
Osmose Inversa (OI)	Todo material solúvel ou em suspensão	Água (solvente)
Diálise (D)	Moléculas de massa molar > 5000 Da	Íons e orgânicos de baixa massa molar
Eletrodiálise (ED)	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons

Tabela 5 - Características básicas das membranas para diferentes processos de separação ^[42].

Processo	Tamanho de Poro	Mecanismo de Separação
Microfiltração (MF)	5-0,05 µm	Por tamanho
Ultrafiltração (UF)	50-30 nm	Por tamanho
Osmose Inversa (OI)	1-0,1 nm	Sorção / difusão
Diálise (D)	10 - 0,1 nm	Difusão
Eletrodiálise (ED)	10 - 0,1 nm	Dif. carga elétrica

Uma outra forma de operar os processos de separação por membranas é a diafiltração. Esse processo é um modo diferente de operar uma MF ou UF fazendo-se uma “lavagem” da solução problema. A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto de uma solução, onde os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse. Assim, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado, enquanto a membrana

retém o soluto de interesse. Uma vez alcançada a pureza desejada, interrompe-se a adição de solvente e se necessário pode-se efetuar a concentração de soluto purificado. A diafiltração também pode ser operada em regime semi-contínuo, com o solvente sendo adicionado por etapas.

A Figura 27 apresenta a faixa de atuação dos diferentes processos com membranas assim como alguns processos clássicos de separação em função do tamanho ou das características físico-químicas das espécies a serem separadas. Atualmente o que tem se mostrado mais vantajosos é o uso desses processos combinados, cada qual atuando na faixa em que é mais eficiente.

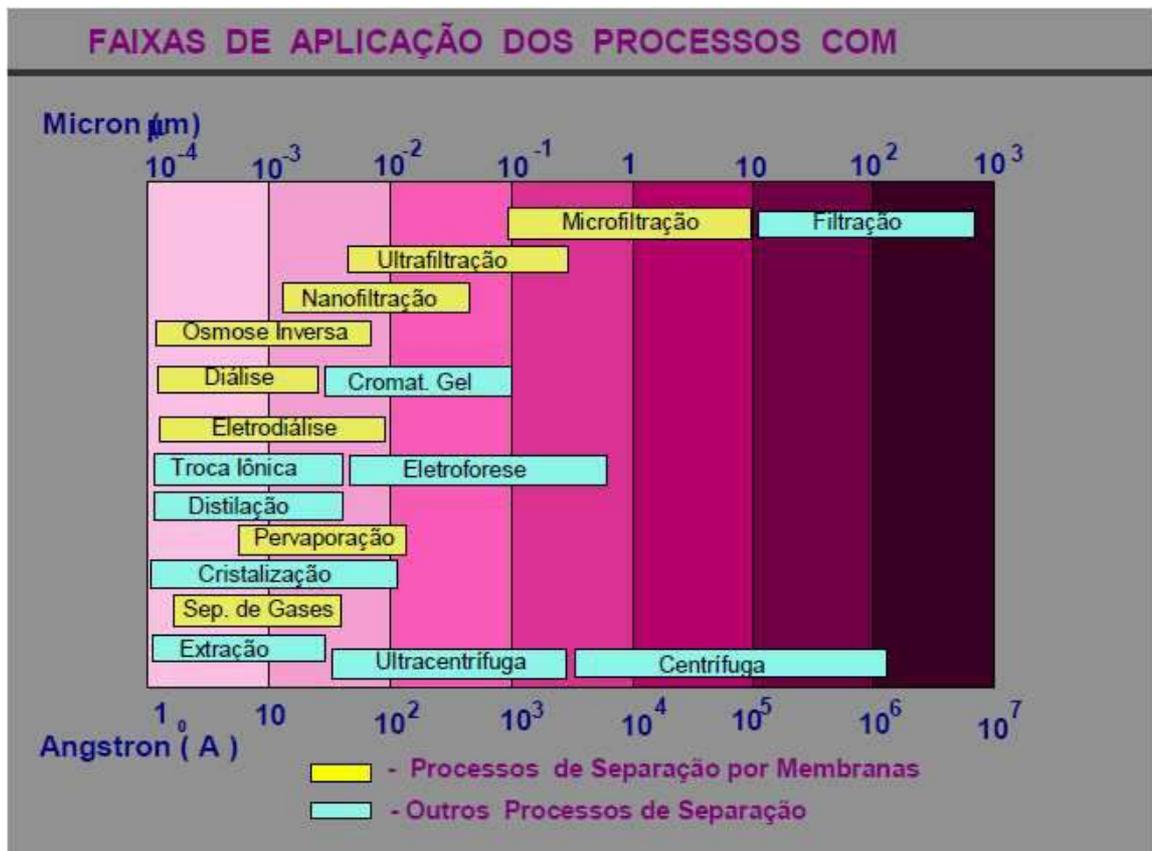


Figura 27. Comparação dos processos tradicionais e com membranas, em função das dimensões das espécies a serem separadas ^[42].

2.7 Inativação Viral

Para obtenção de um biofármaco seguro, o processo de purificação deve inativar e/ou remover os vírus presentes.

Há várias técnicas disponíveis para a inativação viral de proteínas, entre elas radiação ultravioleta, solvente e detergente (SD), pasteurização ^[44] e tratamento com calor, mas este causa desnaturação das proteínas, o que diminuiu sua atividade ^[45]. Nos últimos anos, também vem

sendo utilizada a nanofiltração com membranas específicas, pois os vírus são partículas bem pequenas, mas, como o fator IX tem peso molecular de 55 kDa, próximo ao dos vírus (em torno de 100 kDa), esta técnica geraria muitas perdas do produto se escolhida uma membrana com tamanho de corte para separar vírus do fator.

O método SD é relatado como eficaz para inativação viral do fator IX ^[46]. Nesse método são utilizados solvente orgânico e detergente para destruir a membrana lipídica de vírus envelopados para inativá-los. Após a inativação, o solvente e o detergente precisam ser removidos, podendo ser utilizada a técnica da diafiltração para a troca de solvente.

Este capítulo tem como objetivo realizar uma projeção mercadológica de Fator IX no Brasil. Este fator de coagulação sanguínea é essencial para os portadores de hemofilia B e não é produzido no País, gerando um custo para a União de cerca de 30 milhões de reais anualmente com a importação do produto, sendo o custo médio de cada UI importada de R\$ 0,55.

3.1 Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos

Para a projeção da população de hemofílicos no Brasil, foram utilizados dados da projeção da população brasileira e sua projeção entre os anos de 1980 e 2050, baseados em pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ^[51], combinados com a estatística de que a hemofilia do tipo B afeta 1 a cada 50000 homens.

Com a previsão de partida da fábrica para o ano de 2015 e considerando seu tempo de vida útil de 10 anos ^[15], a população brasileira de hemofílicos foi projetada até o ano de 2025. A Tabela 6 mostra essa projeção.

Tabela 6 – Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos.

Ano	Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos do Tipo B		
	Ambos os Sexos	Masculina	Hemofílicos do Tipo B
1980	118.562.549	58.904.681	1.178
1981	121.381.328	60.284.485	1.206
1982	124.250.840	61.687.329	1.234
1983	127.140.354	63.097.723	1.262
1984	130.082.524	64.532.198	1.291
1985	132.999.282	65.951.859	1.319
1986	135.814.249	67.318.862	1.346
1987	138.585.894	68.662.487	1.373
1988	141.312.997	69.981.494	1.400
1989	143.997.246	71.276.711	1.426
1990	146.592.579	72.524.690	1.450
1991	149.094.266	73.723.060	1.474
1992	151.546.843	74.896.081	1.498
1993	153.985.576	76.063.259	1.521
1994	156.430.949	77.234.980	1.545
1995	158.874.963	78.406.282	1.568
1996	161.323.169	79.579.114	1.592
1997	163.779.827	80.755.823	1.615
1998	166.252.088	81.940.241	1.639
1999	168.753.552	83.139.277	1.663
2000	171.279.882	84.350.720	1.687

Ano	Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos do Tipo B		
	Ambos os Sexos	Masculina	Hemofílicos do Tipo B
2001	173.808.010	85.562.804	1.711
2002	176.303.919	86.758.217	1.735
2003	178.741.412	87.923.721	1.758
2004	181.105.601	89.051.847	1.781
2005	183.383.216	90.135.967	1.803
2006	185.564.212	91.171.295	1.823
2007	187.641.714	92.154.636	1.843
2008	189.612.814	93.084.588	1.862
2009	191.480.630	93.962.767	1.879
2010	193.252.604	94.792.952	1.896
2011	194.932.685	95.577.195	1.912
2012	196.526.293	96.318.292	1.926
2013	198.043.320	97.021.248	1.940
2014	199.492.433	97.690.456	1.954
2015	200.881.685	98.330.018	1.967
2016	202.219.061	98.944.065	1.979
2017	203.510.422	99.535.649	1.991
2018	204.759.993	100.106.940	2.002
2019	205.970.182	100.659.174	2.013
2020	207.143.243	101.193.501	2.024
2021	208.280.241	101.710.492	2.034
2022	209.380.331	102.209.754	2.044
2023	210.441.362	102.690.218	2.054
2024	211.459.352	103.149.892	2.063
2025	212.430.049	103.586.664	2.072

A partir dos dados da Tabela 6, é possível montar o gráfico, ilustrado na Figura 38, da estima da população brasileira de hemofílico do tipo B. diferenciando a estimativa baseada em dados da população, e a baseada na projeção da população.

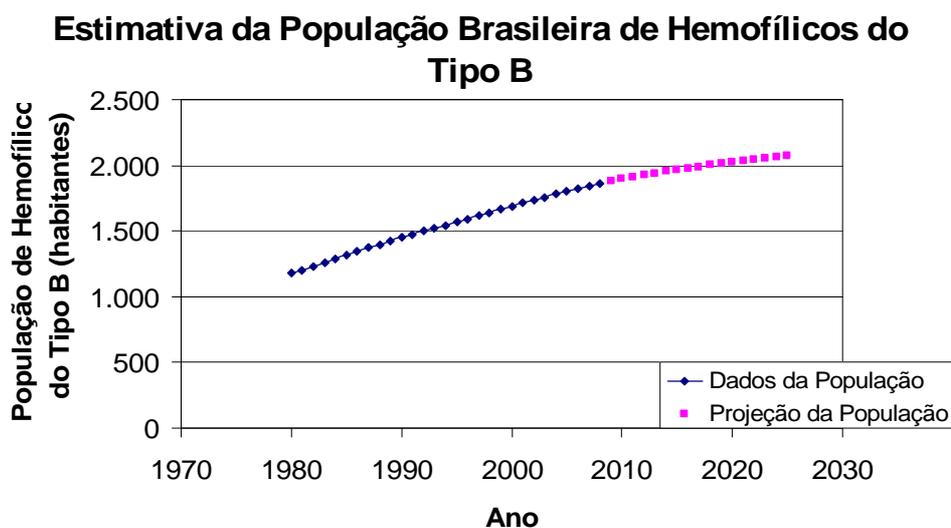


Figura 28. Estimativa da População Brasileira de Hemofílicos do Tipo B entre os Anos 1980 e 2025.

3.2 Estimativa da Demanda Brasileira de Fator IX

Atualmente no Brasil, o fator IX é importado somente para tratamento de episódios hemorrágicos de hemofílicos B, no entanto, o ideal seria que fosse realizada profilaxia para proporcionar melhor qualidade de vida aos portadores.

Para tratamento de episódios hemorrágicos, são necessárias 35000 UI/paciente/ano e para profilaxia, 100000 UI/paciente/ano. Para projeção da demanda brasileira de fator IX, foi utilizado o consumo necessário à profilaxia. A Tabela 7 mostra essa projeção.

Tabela 7 – Estimativa da Demanda Brasileira de Hemofílicos.

Ano	Estimativa da Demanda Brasileira de Fator IX	
	População de Hemofílicos do Tipo B	Demanda (milhões UI/ano)
1980	1.178	118
1981	1.206	121
1982	1.234	123
1983	1.262	126
1984	1.291	129
1985	1.319	132
1986	1.346	135
1987	1.373	137
1988	1.400	140
1989	1.426	143
1990	1.450	145
1991	1.474	147
1992	1.498	150
1993	1.521	152
1994	1.545	154
1995	1.568	157
1996	1.592	159
1997	1.615	162
1998	1.639	164
1999	1.663	166
2000	1.687	169
2001	1.711	171
2002	1.735	174
2003	1.758	176
2004	1.781	178
2005	1.803	180
2006	1.823	182
2007	1.843	184
2008	1.862	186
2009	1.879	188
2010	1.896	190
2011	1.912	191

Ano	Estimativa da Demanda Brasileira de Fator IX	
	População de Hemofílicos do Tipo B	Demanda (milhões UI/ano)
2012	1.926	193
2013	1.940	194
2014	1.954	195
2015	1.967	197
2016	1.979	198
2017	1.991	199
2018	2.002	200
2019	2.013	201
2020	2.024	202
2021	2.034	203
2022	2.044	204
2023	2.054	205
2024	2.063	206
2025	2.072	207

Com a análise de mercado, é possível determinar a capacidade da planta para produção de fator IX recombinante a ser projetada. Como todo o fator IX consumido atualmente no Brasil é importado e que também muitos outros países também o importam, podendo uma possível produção excedente ser exportada, a planta será projetada para atender 100% da demanda do último ano de sua vida útil, que é de 207 milhões de UI por ano.

Este capítulo tem como objetivo consolidar fluxogramas contendo os equipamentos e linhas principais do processo para a planta de produção do fator IX recombinante.

A metodologia para escolha de equipamentos está baseada no processo de produção do fator IX recombinante e no trabalho de Silveira et al. ^[15].

4.1 Descrição do Processo

Neste tópico serão explicados os processos necessários à produção de fator IX recombinante sob condições necessárias para obtenção de um biofármaco eficaz e seguro, assim como o critério de escolha de cada processo utilizado.

Nesta planta pretende-se produzir 207 milhões de UI/ano de fator IX recombinante. Os fármacos serão comercializados nas dosagens de 250, 500, 1000 e 2000 UI em frascos de 10 mL, providos de seringa de 10 mL contendo 5 mL de solução tampão 0,234 %m/v de NaCl para diluição do fator IX antes da injeção no paciente ^[63]. As dosagens do fármaco serão produzidas em proporções iguais.

A primeira etapa do processo de produção do fator é o cultivo celular para sua síntese.

O cultivo celular tem início com o descongelamento de um criotubo contendo células da linhagem CHO ^[48] do banco de células. Esse criotubo é utilizado como inóculo para o primeiro spinner (SPN-10001), dispositivo de vidro para cultivo celular, que também recebe alimentação de meio de cultivo, para a primeira etapa de crescimento celular. O volume de SPN-10001, contendo as células, junto com meio de cultivo, é alimentado no segundo spinner (SPN-10002), de maior volume, para a segunda etapa de cultivo celular. O volume de SPN-10002, contendo as células, junto com meio de cultivo, é alimentado no primeiro biorreator (BRT-10001), para a terceira etapa de cultivo celular. O volume de BRT-10001, contendo as células, junto com meio de cultivo, é alimentado no segundo biorreator (BRT-10002), de maior volume, para a quarta etapa de cultivo celular. Os spinners e biorreatores decritos operam em batelada. O volume de BRT-10002, contendo as células, junto com meio de cultivo, é alimentado no terceiro biorreator (BRT-10003), para a síntese de fator IX recombinante. BRT-10003 opera em perfusão, por este ser o processo de cultivo celular com maior produtividade ao longo do tempo. Como opera em perfusão, BRT-10003 tem operação contínua. Em BRT-10003 é preciso definir os parâmetros a serem monitorados, uma vez que o crescimento de células em um biorreator é algo complexo por necessitar de um meio de cultivo extremamente complexo, composto por aminoácidos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos e glicose. Esse meio de cultivo pode ser dividido em duas partes: a

parte voltada ao crescimento das células e outra para o ajuste das condições do meio, como osmolalidade, promover tamponamento e promover a forças iônicas adequadas. Um outro aspecto importante do cultivo de células animais é o fato de se ter obrigatoriamente duas fontes de carbono: glicose e glutamina, que é metabolizada em glutamato e alfa-cetoglutarato, entrando no ciclo de ácido tri-carboxílicos. No metabolismo destas fontes de carbono, praticamente toda glicose é convertida a lactato e toda glutamina em amônio. A relação entre lactato produzido e glicose consumida e a relação entre amônio produzido por glutamina consumida representam importantes parâmetros de acompanhamento do processo, fornecendo indícios do fluxo metabólico interno da célula a cada momento de cultivo ^[21].

Outro aspecto a ser tratado é o estresse celular no biorreator, pois diferentemente das células microbianas, as células animais não têm parede celular e por isso são mais frágeis. Assim, os sistemas de agitação e aeração devem ser projetados de forma a minimizar a lise das células. Um sistema de aeração sem a formação de bolhas se mostra mais adequado ^[21].

Para o cultivo das células em biorreatores em perfusão deve-se ter a concentração de glicose controlada ao longo das diferentes fases.

Para se fazer o controle do meio fermentado pode-se fazer análises “off-line”, através de amostras e “on-line” no próprio biorreator. Contudo o uso de amostra deve ser utilizado quando se podem obter resultados em tempo real. Procura-se, cada vez mais, fazer o monitoramento “on-line” dos parâmetros de controle do biorreator.

Podem-se monitorar os seguintes parâmetros:

- **Concentração celular**

A concentração celular é um dos parâmetros mais importantes de ser monitorado, pois a partir dele pode-se estimar o consumo de substrato, velocidade específica de crescimento e produção. Essa medida pode ser feita de forma direta ou indireta.

A técnica mais empregada é a turbidimetria, que fornece a densidade ótica (DO) para se estimar a concentração das células viáveis (X). Essa medida pode ser feita desta forma, pois tem-se um meio de cultivo geralmente límpido e as células crescem de forma isoladas umas das outras. Os turbidímetros podem utilizar luz espalhada, transmitida ou mista. Após uma calibração prévia no equipamento pode-se relacionar DO com X, essa relação pode ser desde DO/X como até uma equação de reta ou polinomial ^[21].

- **Oxigênio Dissolvido**

A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido é fundamental para o crescimento celular devido ao seu metabolismo aeróbico.

A maioria das células animais in vivo devem ser expostas a uma concentração de oxigênio entre 3 e 20% da saturação. Porém segundo estudo feito por Jorjani, Ozturk (1999) a velocidade específica de respiração de três linhagens de células (BHK, CHO e hibridoma) em diferentes concentrações celulares de 1 a 20×10^6 , não verificando influência na respiração.

Como apresentado anteriormente um sistema de aeração eficiente seria um sem a formação de bolhas para evitar o estresse celular, como por exemplo o uso de membranas de silicone para a transferência de oxigênio.

A medida de OD é feita por dois eletrodos (um para o sinal de controle e outro para reserva) e é expressa em uma porcentagem da saturação com ar. Controla-se a pressão na entrada do tubo de silicone que alimenta o oxigênio, aumentando ou diminuindo a força motriz.

- **Temperatura**

A temperatura exerce grande influência no meio de cultivo. Segundo Tonso ^[21], células se desenvolvem melhor com a temperatura entre 34 e 37 °C, sendo que para o cultivo em perfusão deve-se utilizar 37°C para a fase de aumento da concentração celular e 34°C para o processo de produção.

O controle de temperatura pode ser feito através de um termômetro imerso em um poço com o caldo da fermentação. A temperatura do caldo da fermentação é comparada com um valor desejado (set-point) e o seu controlador atua na temperatura da camisa de refrigeração.

- **Osmolalidade ou Pressão Osmótica**

Osmolalidade pode ser definida como a molalidade (expressa em mols por quilograma de solvente) numa solução ideal de uma substância que não forma íons, que apresenta a mesma pressão osmótica da solução em questão. Sendo a osmolalidade do soro 290 mmol/kg, os meios de cultura são formulados normalmente para apresentar valores entre 280 e 330 mmol/kg ^[21].

Com as células em crescimento o aumento da osmolalidade faz com que aumente o diâmetro das células, atingindo valores superiores ao da situação normal de cultivo. Por causa desse atraso em relação na resposta à osmolalidade pode-se fazer um aumento gradual nesta do meio.

- **Tamanho das Células**

Pode-se obter a distribuição de tamanho das células através de um contador Coulter, que utiliza vários capilares, ou do CASY 1 TTC, que dispõe de apenas um capilar e de uma curva de calibração previamente aferida.

Com o uso da citometria de fluxo, consegue-se obter uma distribuição do volume das células, além da estimativa de sua viabilidade, dependendo do corante empregado. O método baseia em iluminar um fluxo fino de amostra diluída, de modo que somente uma célula por vez

intercepte o feixe luminoso. A medida da luz espalhada, assim como da fluorescência produzida, permite a obtenção de uma série de dados que podem ser correlacionados com o tamanho ^[21].

Pode-se também determinar o tamanho das células através de análise de imagens obtidas em microscópio.

- **pH**

Mede-se o pH do caldo e compara-se com um set-point caso este esteja abaixo do valor desejado automaticamente adiciona-se uma solução 0,1N de hidróxido de sódio (NaOH) caso contrário adiciona-se gás carbônico através do sistema de aeração.

- **Pressão**

A pressão tem grande influência na transferência de oxigênio utilizado. A pressão é medida na entrada da tubulação de silicone, na saída e na cabeça do fermentador.

- **Volume**

O controle de nível pode ser feito através de um controle de nível ligado a bomba de alimentação para manter constante o nível do reator.

- **Agitação**

O eixo com dois impelidores é agitado através de um acoplamento mecânico por um motor na parte superior do biorreator.

Como dispositivo de separação celular para reciclo de células a BRT-10003, tem-se um hidrociclone (HCL-10001), também operando continuamente. O concentrado de células que é reciclado a BRT-10003, o que caracteriza a operação em perfusão, é a corrente de *underflow* do hidrociclone, e o produto bruto escoar em sua corrente de *overflow*, que alimenta um tanque de equalização (TQE-10001). São produzidos dois volumes de meio de cultivo por dia (2 vvd), o que faz com que TQE-10001 tenha capacidade para armazenar o volume de meio de cultivo contendo o fator IX produzido em 1 dia para alimentar o sistema de microfiltração (MFL-20001). Após a etapa de cultivo celular, todos os equipamentos operam em batelada.

A segunda etapa do processo de produção de fator IX recombinante é a purificação do fator. A primeira etapa de purificação é a remoção das células do meio de cultivo contendo fator IX por microfiltração ^[47, 49]. No sistema de microfiltração (MFL-20001), as células ficam retidas na membrana, constituindo o concentrado, e o fator IX passa através da membrana, constituindo o permeado, que é acondicionado em um tanque de equalização (TQE-20001), com capacidade para armazenar todo o volume de permeado advindo de MFL-20001 para alimentação do primeiro sistema de ultrafiltração (UFL-20001). Em seguida é realizada uma ultra-diafiltração ^[47, 49] para concentração da solução contendo fator IX e troca de tampão para alimentação na primeira coluna de cromatografia (CTA-20001). A etapa de ultra-diafiltração consiste em um sistema de

ultrafiltração (UFL-10001) de modo que o fator IX fique retido na membrana e impurezas de pequeno peso molecular passem pela membrana, e em um tanque de dialisante (TQD-20001) contendo solução para fazer a troca de tampão com o concentrado contendo fator IX. Quando o sistema de ultrafiltração opera em modo de diafiltração, o concentrado é misturado à solução tampão, sendo reciclado a TQE-20001, que opera a volume constante, enquanto o permeado é escoado através da membrana. Quando acaba a passagem de solução tampão na membrana, é realizada a concentração da solução de fator IX, sendo o concentrado escoado para acondicionamento em um tanque de equalização (TQE-20002), que tem capacidade para armazenar todo o volume de concentrado advindo de UFL-20001.

São realizadas quatro etapas de cromatografia ^[47, 49]. A primeira etapa de cromatografia, que consiste em uma coluna de cromatografia de troca aniônica e pseudo-afinidade (CTA-20001), contendo a resina *Q-Sepharose FF*, recebe como amostra o concentrado de UFL-20001. O objetivo dessa etapa é a remoção dos componentes básicos e neutros que não se ligam à resina e também formas inativas de fator IX, uma vez que o fator IX é eluído da resina em um modo de pseudo-afinidade que não é capaz de eluir formas inativas de fator IX, devido a diferenças conformacionais entre as formas do fator. O eluído de CTA-20001 é acondicionado em um tanque de equalização (TQE-20003) com capacidade para armazenar todo esse eluído.

A segunda etapa de cromatografia, que consiste em uma coluna de cromatografia de afinidade (CAF-20001), contendo a resina *Matrex Cellufine Sulfate*, recebe como amostra o eluído de CTA-20001. O objetivo dessa etapa é a remoção de proteínas das células hospedeiras. O eluído de CAF-20001 é acondicionado em um tanque de equalização (TQE-20004) com capacidade para armazenar todo esse eluído e realizar seu ajuste de pH com solução diluída de HCl para alimentação de CTA-20002, próxima coluna de cromatografia.

A terceira etapa de cromatografia, que consiste em uma coluna de cromatografia de troca aniônica (CTA-20002), contendo a resina *Ceramic Hydroxyapatite*, recebe como amostra o eluído de CAF-20001. O objetivo dessa etapa é a remoção de fator IX inativo e outros contaminantes. O eluído de CTA-20002 é acondicionado em um tanque de equalização (TQE-20005) com capacidade para armazenar todo esse eluído.

A quarta etapa de cromatografia, que consiste em uma coluna de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (CAM-20001), contendo a resina *Fractogel-EMD-Chelate*, carregada com íons de cobre (II), que ficam imobilizados nela (*Fractogel-EMD-Chelate-Cu(II)*) recebe como amostra o eluído de CTA-20002. O objetivo dessa etapa é a remoção de contaminantes. O eluído de CAM-20001 é acondicionado em um tanque de equalização (TQE-

20006) com capacidade para armazenar todo esse eluído para alimentação em um segundo sistema de ultrafiltração (UFL-20002).

O objetivo de UFL-20002 é concentrar o fator IX para a etapa de inativação viral e a concentração é tal que possibilite a produção das dosagens de 250, 500, 1000 e 2000 UI em frascos de 10 mL. O concentrado de UFL-20002, que contém o fator IX, é então encaminhado ao tanque de inativação viral (TQI-20001).

Para inativação viral em TQI-20001 é utilizado o método do solvente e detergente, com TNBP e Triton X-100 ^[15, 46].

Depois da inativação viral, é realizada uma segunda etapa de ultra-diafiltração com o objetivo de trocar o tampão do fator IX por água de injeção (*WFI-Water for Injection*) e concentrar diferentemente a solução advinda de TQI-20001 para cada dosagem desejada do fármaco. A solução de fator IX é concentrada diferenciadamente para cada dosagem no terceiro sistema de ultrafiltração (UFL-20003) e troca de tampão com a água de injeção contida no segundo tanque de dialisante (TQD-20002).

O concentrado de UFL-20003 é encaminhado para a terceira etapa de produção do fator IX que é a formulação em TQF-20001, onde são adicionados estabilizantes para melhorar as características do produto na etapa posterior de liofilização ^[49].

Por final, o fator IX formulado é envasado ^[15] em frascos de 10 mL e liofilizado ^[15], respectivamente por ENV-30001 e LIO-30001, sendo disponibilizado em sua forma final de pó.

A Figura 29 mostra o diagrama de blocos simplificado do processo para produção de fator IX recombinante descrito acima.

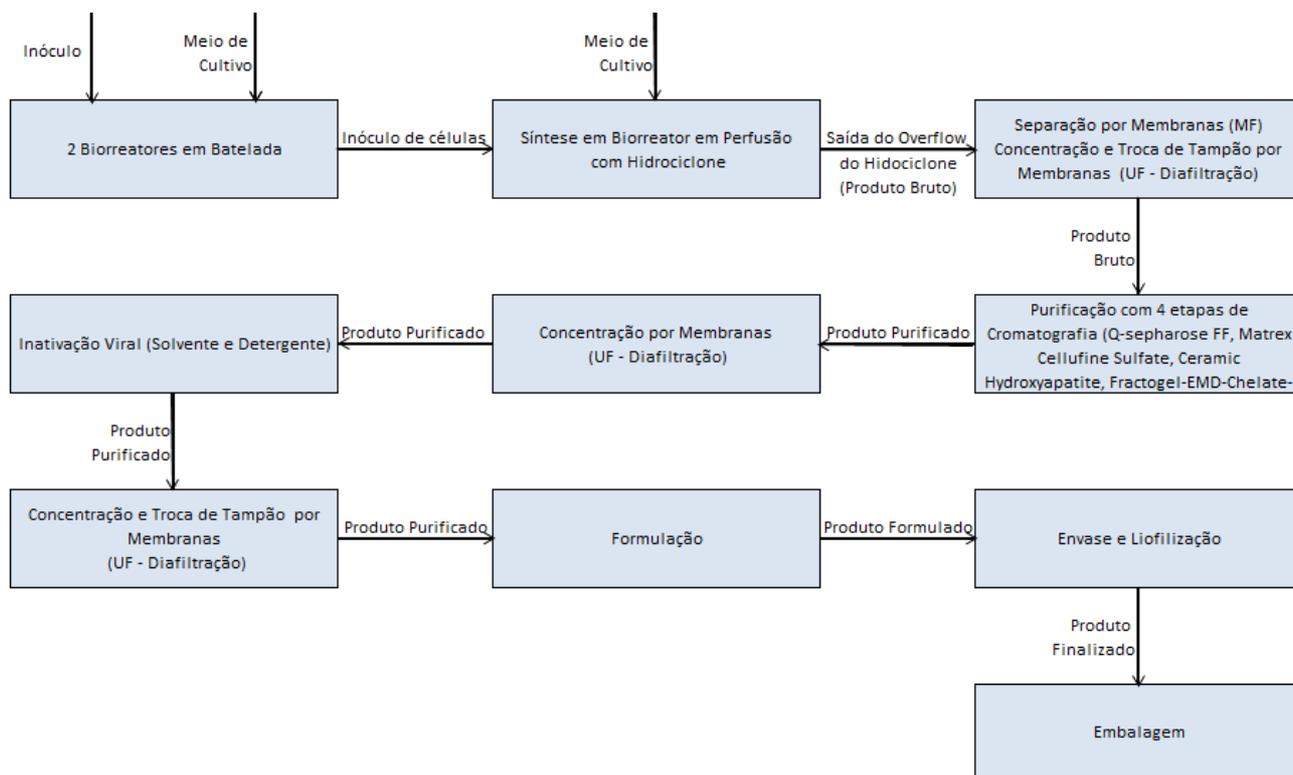


Figura 29. Diagrama de Blocos Simplificado do Processo de Produção do Fator IX Recombinante.

4.2 Classificação das Áreas da Planta

Como os fármacos injetáveis na corrente sanguínea têm que ser produtos de alta pureza, sua produção deve ser feita em áreas limpas. Nessas áreas, o suprimento e a distribuição de ar, a filtragem, os materiais de construção e os procedimentos de operação visam controlar as concentrações de partículas em suspensão no ar, atendendo aos níveis apropriados de limpeza, conforme definidos pelo usuário e de acordo com normas técnicas vigentes. As normas definem, entre outros aspectos, a classificação dos ambientes quanto aos níveis de contaminação, técnicas construtivas adequadas, procedimentos operacionais e procedimentos de teste para verificação de limpeza do

Aba

- **Federal Standard 209** – *Airborne Particulate Cleanliness Classes in Clean Rooms and Clean Zones*

A primeira edição da norma Federal Standard 209 data de 1963, nos Estados Unidos, sob

o título “Clean Room and Workstation Requirements, Controlled Environments”. A norma define classes de limpeza do ar e estabelece métodos para medição da limpeza do ar em ambientes controlados.

A norma foi cancelada em novembro de 2001, mas continua a ser utilizada frequentemente.

- **ISO 14644** – *Cleanrooms and associated controlled environments*

Esta norma ISO foi primeiramente aplicada na União Européia em 1999 e em seguida nos Estados Unidos em 2001, onde vem substituindo a norma Federal Standard 209. A ISO 14644 é composta por 8 partes: classificação da limpeza do ar; especificações para teste e monitoramento para provar contínua validação; metrologia e métodos de teste; projeto, construção e operação; operação; termos e definições; dispositivos separadores e contaminação molecular.

- **NBR 13700** - Áreas limpas - Classificação e controle de contaminação

Com data de publicação em Junho de 1996, a norma brasileira estabelece classes-padrão de limpeza do ar e provê classes intermediárias para salas e zonas de trabalho limpas baseadas em concentrações especificadas de partículas em suspensão no ar. Prescreve métodos para verificação da classe e requer um plano estabelecido para monitoramento de limpeza do ar. Também fornece um método para determinação e descrição das concentrações (indicador U) de partículas ultrafinas. Foi elaborada baseada na Norma Federal Standard 209.

As Tabelas 8 a 10 mostram a classificação de áreas limpas de acordo com o número e o tamanho de partículas permitidas por volume de ar segundo, respectivamente, as normas Federal Standard 209E, ISO 14644-1 e NBR 13700.

Tabela 8 – Classificação de Áreas Limpas pela Norma Federal Standard 209E ^[67].

Classe	Nº máximo de partículas/ ft ³ equivalente ISO					Equivalente ISO
	≥0.1 µm	≥0.2 µm	≥0.3 µm	≥0.5 µm	≥5 µm	
1	35	7	3	1		ISO3
10	350	75	30	10		ISO4
100		750	300	100		ISO5
1.000				1.000	7	ISO6
10.000				10.000	70	ISO7
100.000				100.000	700	ISO8

Tabela 9 – Classificação de Áreas Limpas pela Norma ISSO-14644-1 ^[67].

Classe	Nº máximo de partículas/ m ³ equivalente ISO						Equivalente ISO
	≥0.1 µm	≥0.2 µm	≥0.3 µm	≥0.5 µm	≥1 µm	≥5 µm	
ISO1	10	2					
ISO2	100	24	10	4			
ISO3	1.000	237	102	35	8		Classe 1
ISO4	10.000	2.370	1.020	352	83		Classe 10
ISO5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29	Classe 100
ISO6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293	Classe 1.000
ISO7				352.000	83.200	2.930	Classe 10.000
ISO8				3.520.000	832.000	29.300	Classe 100.000
ISO9				35.200.000	8.320.000	293.000	Ar da Sala

Tabela 10 – Classificação de Áreas Limpas pela Norma NBR 13700 ^[68].

NBR 13700		Limites de Classe									
Classe		0,1 µm		0,2 µm		0,3 µm		0,5 µm		5 µm	
SI	EUA	unidade de volume									
		m ³	ft ³								
M1		350	9,91	7,57	2,14	30,9	0,875	10	0,283		
M1,5	1	1240	35	265	7,5	106	3	35,3	1		
M2		3500	99,1	75,7	21,4	309	8,75	100	2,83		
M2,5	10	12400	350	2650	75	1060	30	353	10		
M3		35000	991	757	214	3090	87,5	1000	28,3		
M3,5	100			26500	750	10600	300	3530	100		
M4				7570	2140	30900	875	10000	283		
M4,5	1000							35300	1000	247	7
M5								100000	2830	618	17,5
M5,5	10000							353000	10000	2470	70
M6								1000000	28300	6180	175
M6,5	100000							3530000	100000	24700	700
M7								10000000	283000	61800	1750

A Tabela 11 mostra a equivalência das classificações entre as normas.

Tabela 11 – Equivalência das Classificações entre as normas ^[68].

FED STD	EUROPA	SI	ISO
100	A/B	M3,5	ISO5
10.000	C	M5,5	ISO7
100.000	D	M6,5	ISO8

Para a classificação das áreas da planta para produção de fator IX recombinante, foi utilizada a resolução 134/01 na norma NBR 13700, descrita na Tabela 12, e a metodologia utilizada por Silveira, et al. [15].

Tabela 12 – Classificação de Áreas segundo a Resolução 143/01 da Norma NBR 13700 [68].

Tipo de Esterilização	Preparação	Enchimento Final
Produto com esterilização final	Grau C ou D	Grau A
Produto esterilizado por filtração	Grau C ou D	Grau A ou B
Produtos estéreis produzidos a partir de matérias-primas estéreis	Grau A e B	Grau A e B

A planta será dividida em três áreas, esquematizadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Identificação, Descrição e Classificação das Áreas da Planta para Produção de Fator IX Recombinante.

Identificação	Descrição	Classificação (FED STD / ISO)
10	Cultivo Celular para Síntese de Fator IX Recombinante	10.000 / ISO7
20	Purificação de Fator IX Recombinante	1.000 / ISO6
30	Envase e Liofilização de Fator IX Recombinante	100 / ISO5

A Figura 30 ilustra diagrama de blocos simplificado do processo dividido nas áreas definidas.

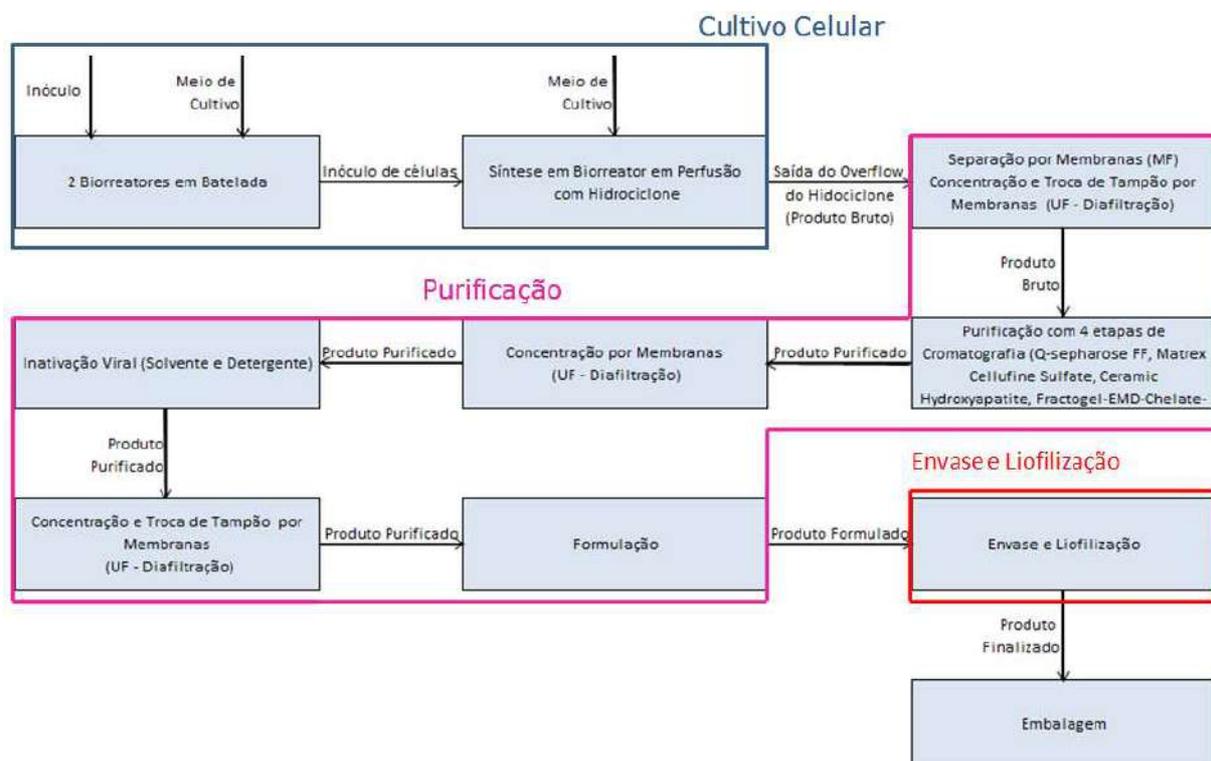
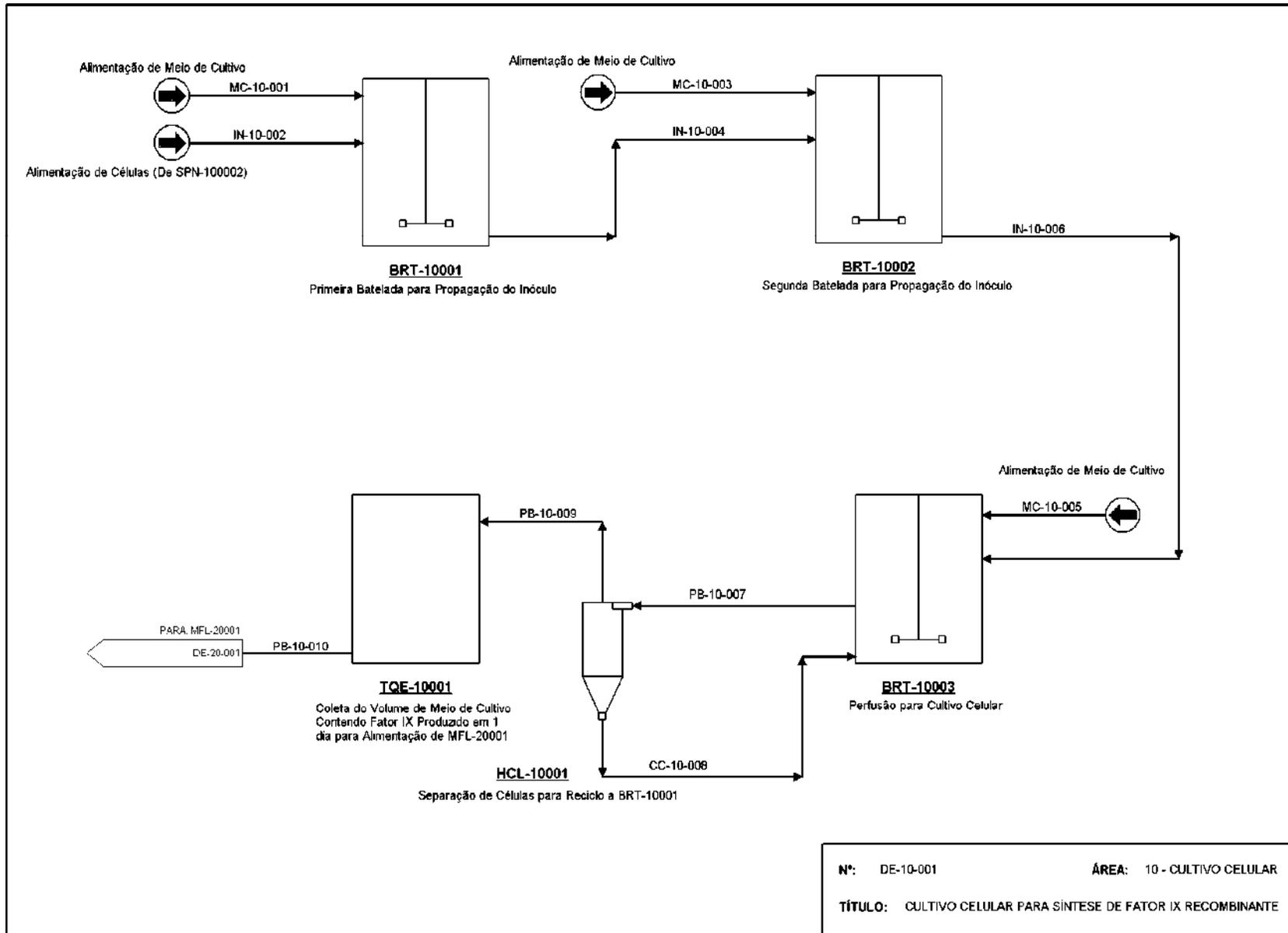


Figura 30. Diagrama de Blocos Simplificado do Processo de Produção do Fator IX Recombinante Dividido em Áreas.

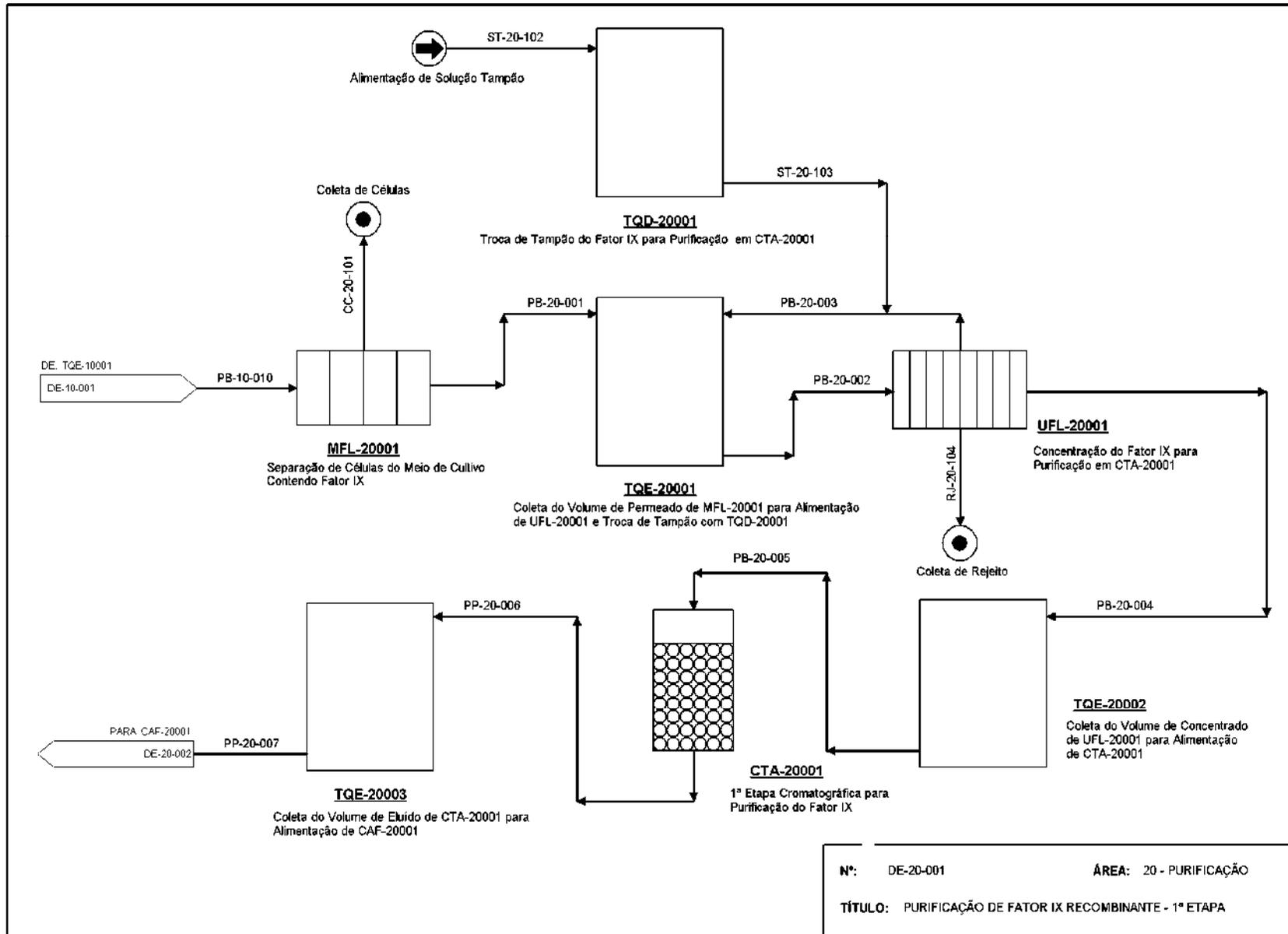
4.3 Fluxogramas

O diagrama de blocos simplificado foi detalhado, originando os Fluxogramas de 01 a 05, que esquematizam os processos realizados para a produção de fator IX recombinante nas três áreas da planta.

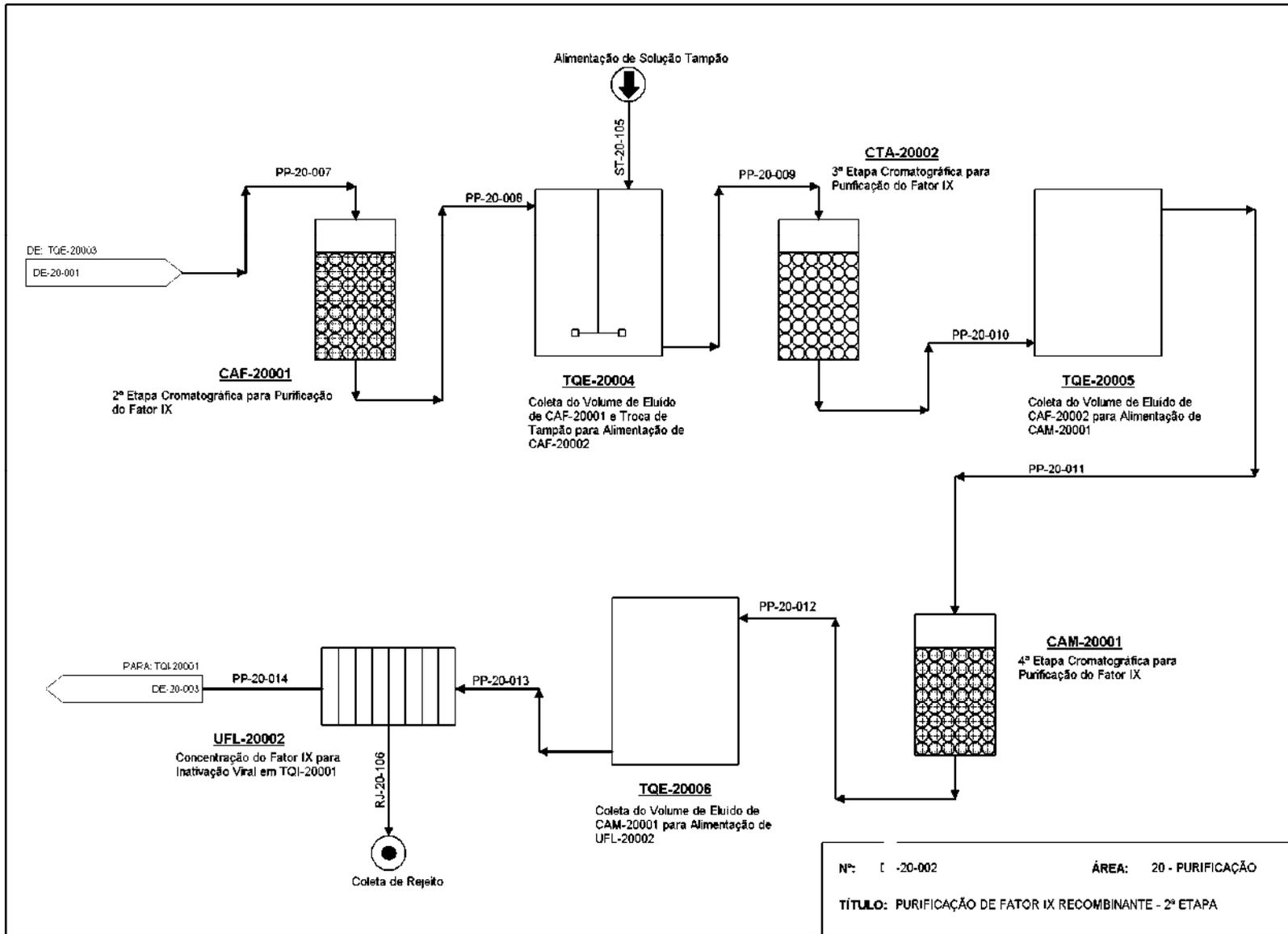
Fluxograma 01. DE-10-001: Cultivo Celular para Síntese de Fator IX Recombinante.



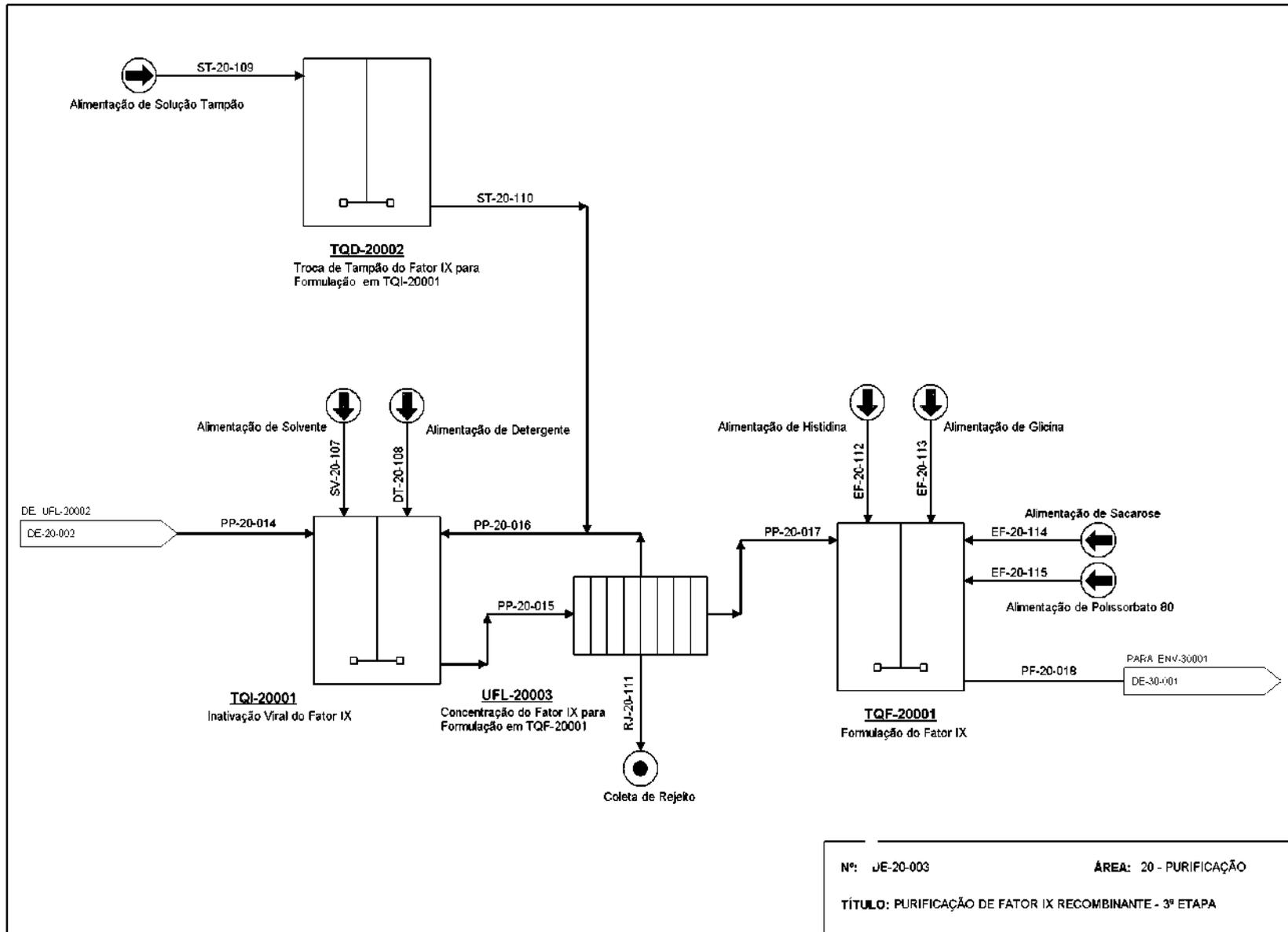
Fluxograma 02. DE-20-001: Purificação de Fator IX Recombinante – 1ª Etapa.



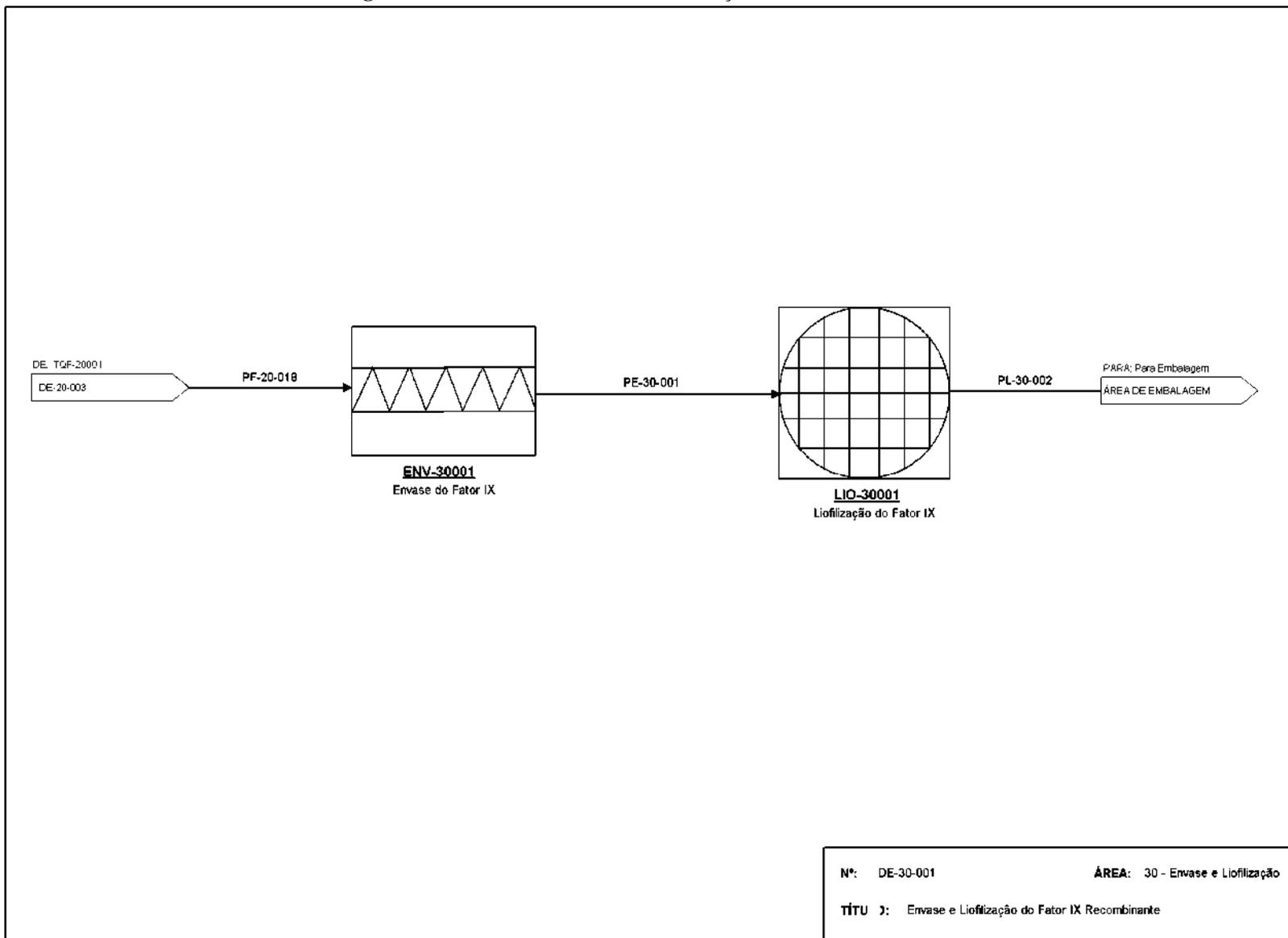
Fluxograma 03. DE-20-002: Purificação de Fator IX Recombinante – 2ª Etapa.



Fluxograma 04. DE-20-003: Purificação de Fator IX Recombinante – 3ª Etapa.



Fluxograma 05. DE-30-001: Envase e Liofilização de Fator IX Recombinante.



4.4 Lista de Equipamentos

A Tabela 14 mostra a lista de equipamentos da planta para produção de fator IX recombinante.

Tabela 14 – Lista de Equipamentos: Área, TAG, Nº de Ordem, Descrição, Serviço e Fluxograma.

ÁREA	TAG	Nº DE ORDEM	DESCRIÇÃO	SERVIÇO	FLUXOGRAMA
10	BRT-10001	001	Biorreator	Primeira Batelada para Propagação do Inóculo	DE-10-001
10	BRT-10002	002	Biorreator	Segunda Batelada para Propagação do Inóculo	DE-10-001
10	BRT-10003	003	Biorreator	Perfusão para Cultivo Celular	DE-10-001
10	HCL-10001	001	Hidrociclone	Separação de Células para Reciclo a BRT-10001	DE-10-001
10	TQE-10001	001	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Meio de Cultivo Contendo Fator IX Produzido em 1 dia para Alimentação de MFL-20001	DE-10-001
20	CAF-20001	001	Coluna de Afinidade	2ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX	DE-20-002
20	CAM-20001	001	Coluna de Afinidade com Metal Imobilizado	4ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX	DE-20-002
20	CTA-20001	001	Coluna de Troca Aniônica	1ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX	DE-20-001
20	CTA-20002	002	Coluna de Troca Aniônica	3ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX	DE-20-002
20	MFL-20001	001	Sistema de Microfiltração	Separação de Células do Meio de Cultivo Contendo Fator IX	DE-20-001
20	TQD-20001	001	Tanque de Dialisante	Troca de Tampão do Fator IX para Purificação em CTA-20001	DE-20-001
20	TQD-20002	002	Tanque de Dialisante	Troca de Tampão do Fator IX para Formulação em TQI-20001	DE-20-003
20	TQE-20001	001	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Permeado de MFL-20001 para Alimentação de UFL-20001 e Troca de Tampão com TQD-20001	DE-20-001
20	TQE-20002	002	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Concentrado de UFL-20001 para Alimentação de CTA-20001	DE-20-001
20	TQE-20003	003	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Eluído de CTA-20001 para Alimentação de CAF-20001	DE-20-001
20	TQE-20004	004	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Eluído de CAF-20001 e Troca de Tampão para Alimentação de CTA-20002	DE-20-002
20	TQE-20005	005	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Eluído de CTA-20002 para Alimentação de CAM-20001	DE-20-002
20	TQE-20006	006	Tanque de Equalização	Coleta do Volume de Eluído de CAM-20001 para Alimentação de UFL-20002	DE-20-002
20	TQF-20001	001	Tanque de Formulação	Formulação do Fator IX	DE-20-003
20	TQI-20001	001	Tanque de Inativação Viral	Inativação Viral do Fator IX	DE-20-003
20	UFL-20001	001	Sistema de Ultrafiltração	Concentração do Fator IX para Purificação em CTA-20001	DE-20-001
20	UFL-20002	002	Sistema de Ultrafiltração	Concentração do Fator IX para Inativação Viral em TQI-20001	DE-20-002
20	UFL-20003	003	Sistema de Ultrafiltração	Concentração do Fator IX para Formulação em TQF-20001	DE-20-003
30	ENV-30001	001	Envasadora	Envase do Fator IX	DE-30-001
30	LIO-30001	001	Liofilizador	Liofilização do Fator IX	DE-30-001

4.5 Lista de Linhas

A Tabela 15 mostra a lista de linhas da planta para produção de fator IX recombinante.

Tabela 15 – Lista de Linhas: Área, Nº de Ordem, TAG, Fluido, Descrição, Fluxograma, Origem e Destino das Linhas.

ÁREA	Nº DE ORDEM	TAG	FLUIDO	DESCRIÇÃO	FLUXOGRAMA	DE	PARA
10	001	MC-10-001	MC	Meio de Cultivo	DE-10-001	Alimentação de Meio de Cultivo	BRT-10001
10	002	IN-10-002	IN	Inóculo	DE-10-001	Alimentação de Células (De SPN-100002)	BRT-10001
10	003	MC-10-003	MC	Meio de Cultivo	DE-10-001	Alimentação de Meio de Cultivo	BRT-10002
10	004	IN-10-004	IN	Inóculo	DE-10-001	BRT-10001	BRT-10002
10	005	MC-10-005	MC	Meio de Cultivo	DE-10-001	Alimentação de Meio de Cultivo	BRT-10003
10	006	IN-10-006	IN	Inóculo	DE-10-001	BRT-10002	BRT-10003
10	007	PB-10-007	PB	Produto Bruto	DE-10-001	BRT-10003	HCL-10001
10	008	CC-10-008	CC	Concentrado de Células	DE-10-001	HCL-10001	BRT-10003
10	009	PB-10-009	PB	Produto Bruto	DE-10-001	HCL-10001	TQE-10001
10	010	PB-10-010	PB	Produto Bruto	DE-10-001; DE-20-001	TQE-10001	MFL-20001
20	001	PB-20-001	PB	Produto Bruto	DE-20-001	MFL-20001	TQE-20001
20	002	PB-20-002	PB	Produto Bruto	DE-20-001	TQE-20001	UFL-20001
20	003	PB-20-003	PB	Produto Bruto	DE-20-001	UFL-20001	TQE-20001
20	004	PB-20-004	PB	Produto Bruto	DE-20-001	UFL-20001	TQE-20002
20	005	PB-20-005	PB	Produto Bruto	DE-20-001	TQE-20002	CTA-20001
20	006	PP-20-006	PP	Produto Purificado	DE-20-001	CTA-20001	TQE-20003
20	007	PP-20-007	PP	Produto Purificado	DE-20-001; DE-20-002	TQE-20003	CAF-20001
20	008	PP-20-008	PP	Produto Purificado	DE-20-002	CAF-20001	TQE-20004
20	009	PP-20-009	PP	Produto Purificado	DE-20-002	TQE-20004	CTA-20002
20	010	PP-20-010	PP	Produto Purificado	DE-20-002	CTA-20002	TQE-20005
20	011	PP-20-011	PP	Produto Purificado	DE-20-002	TQE-20005	CAM-20001
20	012	PP-20-012	PP	Produto Purificado	DE-20-002	CAM-20001	TQE-20006
20	013	PP-20-013	PP	Produto Purificado	DE-20-002	TQE-20006	UFL-20002
20	014	PP-20-014	PP	Produto Purificado	DE-20-002; DE-20-003	UFL-20002	TQI-20001
20	015	PP-20-015	PP	Produto Purificado	DE-20-003	TQI-20001	UFL-20003
20	016	PP-20-016	PP	Produto Purificado	DE-20-003	UFL-20003	TQI-20001
20	017	PP-20-017	PP	Produto Purificado	DE-20-003	UFL-20003	TQF-20001
20	018	PF-20-018	PF	Produto Formulado	DE-20-003; DE-30-001	TQF-20001	ENV-30001

ÁREA	Nº DE ORDEM	TAG	FLUIDO	DESCRIÇÃO	FLUXOGRAMA	DE	PARA
20	101	CC-20-101	CC	Concentrado de Células	DE-20-001	MFL-20001	Coleta de Células
20	102	ST-20-102	ST	Solução Tampão	DE-20-001	Alimentação de Solução Tampão	TQD-20001
20	103	ST-20-103	ST	Solução Tampão	DE-20-001	TQD-20001	PB--20-003
20	104	RJ-20-104	RJ	Rejeito	DE-20-001	UFL-20001	Coleta de Rejeito
20	105	ST-20-105	ST	Solução Tampão	DE-20-002	Alimentação de Solução Tampão	TQE-20004
20	106	RJ-20-106	RJ	Rejeito	DE-20-002	UFL-20002	Coleta de Rejeito
20	107	SV-20-107	SV	Solvente	DE-20-003	Alimentação de Solvente	TQI-20001
20	108	DT-20-108	DT	Detergente	DE-20-003	Alimentação de Detergente	TQI-20001
20	109	ST-20-109	ST	Solução Tampão	DE-20-003	Alimentação de Solução Tampão	TQD-20002
20	110	ST-20-110	ST	Solução Tampão	DE-20-003	TQD-20002	PP--20-016
20	111	RJ-20-111	RJ	Rejeito	DE-20-003	UFL-20003	Coleta de Rejeito
20	112	EF-20-112	EF	Estabilizante de Formulação	DE-20-003	Alimentação de Histidina	TQF-20001
20	113	EF-20-113	EF	Estabilizante de Formulação	DE-20-003	Alimentação de Glicina	TQF-20001
20	114	EF-20-114	EF	Estabilizante de Formulação	DE-20-003	Alimentação de Sacarose	TQF-20001
20	115	EF-20-115	EF	Estabilizante de Formulação	DE-20-003	Alimentação de Polissorbato 80	TQF-20001
30	001	PE-30-001	PE	Produto Envasado	DE-30-001	ENV-30001	LIO-30001
30	002	PL-30-002	PL	Produto Liofilizado	DE-30-001	LIO-30001	Para Embalagem

Este capítulo tem como objetivo dimensionar todos os equipamentos principais, já identificados com TAGs no capítulo 4, presentes na planta de produção de fator IX recombinante e, com base nesse dimensionamento, projetar a área útil das três áreas constituintes da planta.

5.1 BRT-10003: Biorreitor em Perfusão

No biorreitor BRT-10003 é onde ocorrerá a produção efetiva de fator IX recombinante para atender à demanda anual de 207 milhões de UI. Foi determinado que ele operaria em perfusão por este ser o método de cultivo celular que apresenta a maior produtividade ao longo do tempo. O biorreitor opera continuamente em perfusão de 3 a 6 meses. O fator IX será sintetizado por células da linhagem CHO, cuja produtividade do fator por 10^6 células é $17 \mu\text{g}$ de fator IX recombinante por dia ($17 \mu\text{g rFIX/ dia/ } 10^6 \text{ células}$) [48].

Em relação ao rendimento global do processo, a Tabela 16 mostra o rendimento de cada processo posterior ao cultivo celular.

Tabela 16 – Rendimento de cada Processo após o Cultivo Celular.

Processo	Rendimento (%)	Rendimento Global (%)
Microfiltração (*)	95	43
Ultra/Diafiltração (*)	95	
Cromatografia de troca aniônica (**)	90	
Cromatografia de afinidade (**)	90	
Cromatografia de afinidade (**)	90	
Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (**)	95	
Ultrafiltração (*)	95	
Inativação Viral [15]	85	
Ultra/Diafiltração (*)	95	
Liofilização [15]	90	
Envase [15]	100	

(*) Dado do fabricante do equipamento.

(**) Dado do fabricante da resina.

Como os processos listados operam em série, o rendimento global foi calculado pela equação (1):

$$R = \prod_{j=1}^{np} r_j \quad (1)$$

Na equação (1), R é o rendimento global, r_j é o rendimento de cada processo e np é o número de processos, que, pela Tabela 16, é igual a 0,43 (42%).

Como o rendimento global é de 43% e a demanda anual é de 207 milhões de UI, o biorreator BRT-100003 necessita produzir 480 milhões de UI por ano.

Com os dados da tabela 17 é possível o dimensionamento do equipamento.

Tabela 17 – Parâmetros para Dimensionamento de BRT-100003.

Parâmetro	Valores
Atividade rFIX (UI/mg) ^[47]	16,5
Atividade específica do sangue (UI/ µg rFIX ativo)	0,2
Atividade específica do fator IX recombinante produzido em relação à atividade específica do sangue (%) ^[48]	12
Atividade específica rFIX ativo (UI/ µg rFIX ativo)	0,024
Tempo de operação (dias/ano) ^(*)	200
Produtividade rFIX ativo (µg rFIX ativo/dia/10 ⁶ células) ^[48]	17
Concentração células em perfusão (células/mL) ^(*)	2,0 x10 ⁷
Taxa de Perfusão (vvd) ^(*)	2
Porcentagem utilizada do Biorreator (%) ^{(*), (**)}	70

(*) Dados de projeto.

(**) Porcentagem considerada para margem de segurança do volume operacional e espaço para dispositivos de controle.

Para a produção anual de 480 milhões de UI de fator IX, com a atividade específica do fator IX ativo, se calcula a massa de fator IX ativo a ser produzida em um ano. O tempo de operação anual possibilita o conhecimento da massa de fator IX ativa a ser produzida em 1 dia de operação, que é de 99,94g. Combinando a produtividade de fator IX ativo com a concentração de células em perfusão, calcula-se o volume operacional para a produção de fator IX ativo de um dia de operação.

Como a taxa de perfusão é de 2 vvd, ou seja, serão produzidos 2 volumes de meio por dia, o volume operacional de BRT-10003 é a metade do volume operacional da produção de 1 dia, sendo ele 147 L. Com a porcentagem utilizada do biorreator, seu volume de projeto será de 210 L. As equações que esquematizam os cálculos realizados se encontram no Anexo 9.1.

A Figura 31 ilustra um biorreator.



Figura 31. Biorreator.

Por uma questão asséptica, todos os biorreatores e tanques utilizados em todo o processo serão providos de bolsas plásticas estéreis de mesmo volume que serão trocadas a cada ciclo de produção. Dessa maneira, caso haja contaminação em uma batelada, isso não compromete as bateladas seguintes. A Figura 32 mostra uma bolsa plástica estéril no interior de um tanque.



Figura 32. Bolsa Plástica Estéril em Operação no Interior de um Tanque.

5.1.1 Folha de Especificações de BRT-10003

A Folha de Especificações 01 mostra as principais características de BRT-10003.

Folha de Especificações 01 – BTR-10003.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	10 – Cultivo Celular
TAG	BRT-10003
Nº de Ordem	003
Descrição	Biorreator
Serviço	Perfusão para Cultivo Celular
P&ID	DE-10-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
MC-10-005	PB-10-007
IN-10-006	
CC-10-008	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Sistema de Aeração	
Sistema de Monitoramento e Controle de Parâmetros Críticos ao Cultivo Celular e Produção do Fator IX	
Concentração Inicial de Células (células/mL)	2×10^7
Concentração Operacional de Células (células/mL)	2×10^5
Volume (L)	210

5.2 BRT-10001 e BRT-10002: Biorreatores em Batelada

Para a inoculação de um dispositivo de cultivo celular, incluindo biorreatores, a concentração de inoculação é sempre a mesma, que está descrita na Tabela 18. Dessa maneira, a inoculação de um biorreator é feita por um outro de menor volume.

Com o volume operacional de BRT-10003 e a concentração de células para inoculação, é possível calcular a quantidade de células necessárias para inoculá-lo.

Foi determinado que dispositivos para inoculação poderiam operar em batelada, por ser uma operação mais simples e não haver necessidade de o cultivo celular para crescimento ser em perfusão. Como não há reciclo de células assim como na operação em perfusão, a concentração de células em batelada, presente na Tabela 18, é de uma ordem de grandeza dez vezes menor que a concentração de células em perfusão.

O biorreator BRT-10002 foi dimensionado para inocular BRT-10003. Tendo-se a quantidade de células que necessitam estar presentes em BRT-10002 para a inoculação e a concentração de células em batelada, é possível calcular seu volume operacional é de 29 L. Considerando que a porcentagem de utilização de BRT-10002 como 70 %, seu volume de projeto é de 42 L.

A Tabela 18 contém as concentrações celulares necessárias aos biorreatores que servirão como inoculo de um outro de volume maior.

Tabela 18 – Parâmetros de Concentração Celular.

Parâmetro	Valor
Concentração de células em batelada (células /mL)	$1,0 \times 10^6$
Concentração de células para inoculação (células /mL)	$2,0 \times 10^5$

O biorreator BRT-10001 foi dimensionado para inocular BRT-10002. Analogamente ao dimensionamento deste, com as concentrações celulares da Tabela 9 e seu volume operacional de 29 L, é possível calcular a quantidade de células a ser inoculada nele para cálculo do volume operacional de BRT-10001, que é de 6 L. Considerando que a porcentagem de utilização de BRT-10001 como 70 %, seu volume de projeto é de 9 L.

As equações que esquematizam o dimensionamento dos biorreatores operando em batelada se encontram no Anexo 9.2.

5.2.1 Folha de Especificações de BRT-10001

A Folha de Especificações 02 mostra as principais características de BRT-10001.

Folha de Especificações 02 – BTR-10001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	10 – Cultivo Celular
TAG	BRT-10001
Nº de Ordem	001
Descrição	Biorreator
Serviço	Primeira Batelada para Propagação do Inóculo
P&ID	DE-10-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
MC-10-001	IN-10-004
IN-10-002	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Sistema de Aeração	
Sistema de Monitoramento e Controle de Parâmetros Críticos ao Cultivo Celular e Produção do Fator IX	
Concentração Inicial de Células (células/mL)	2×10^6
Concentração Operacional de Células (células/mL)	2×10^5
Volume (L)	9

5.2.2 Folha de Especificações de BRT-10002

A Folha de Especificações 03 mostra as principais características de BRT-10002.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	10 – Cultivo Celular
TAG	BRT-10002
Nº de Ordem	002
Descrição	Biorreator
Serviço	Primeira Batelada para Propagação do Inóculo
P&ID	DE-10-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
MC-10-003	IN-10-006
IN-10-004	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Sistema de Aeração	
Sistema de Monitoramento e Controle de Parâmetros Críticos ao Cultivo Celular e Produção do Fator IX	
Concentração Inicial de Células (células/mL)	2×10^6
Concentração Operacional de Células (células/mL)	2×10^5
Volume (L)	42

5.3 SPN-10001 e SPN-10002: Spinners

Seguindo o raciocínio do dimensionamento de BRT-10002 e BRT-10001, foi calculado o volume de mais um biorreator em batelada para ser inóculo de BRT-10001. Os cálculos se encontram no Anexo 9.2.

Como o volume operacional deste possível biorreator foi de 1,2 L, este foi considerado como um spinner, que é um dispositivo de cultivo celular em batelada de vidro, que, por ser móvel, não é representado no fluxograma, mas recebe o TAG SPN-10002 para identificar que nessa etapa do processo é necessário um spinner para comportar 1,2 L de meio de cultura.

Também foi calculado o volume operacional de um outro spinner para inóculo de SPN-10002 com sendo 0,24 L. Este spinner recebe o TAG de SPN-10002 para identificá-lo como um spinner que comporta 0,24 L de meio de cultura. Para inoculá-lo, não será necessário um outro spinner e sim um criotubo, devido ao volume operacional e quantidade de células para inoculação, que são, respectivamente, 47 mL e $4,70 \times 10^7$ células.

5.4 HCL-100001: Hidrociclone

Como dispositivo de separação de células para reciclo a BRT-10003 foi escolhido um hidrociclone por este ser externo ao biorreator, o que permite que a operação e os fatores de ampliação de escala sejam independentes da operação do biorreator, e possibilita sua substituição em caso de pane sem interromper o cultivo celular.

Além disso, é um equipamento simples que pode ser facilmente projetado para promover a separação desejada e cuja performance pode ser facilmente estimada. Por não ter partes móveis, opera sob condições assépticas requeridas pela indústria de biotecnologia e também não requer manutenção, o que evita riscos adicionais de contaminação, permitindo operação contínua por longo período de tempo.

Para o dimensionamento de um hidrociclone assim como a necessidade de uma bateria deles em paralelos para o processo, foram utilizados como referência resultados experimentais obtidos com hidrociclones construídos especificamente para retenção de células animais descritos por Castilho e Medronho ^[18]. O hidrociclone (ou a bateria deles, se necessário mais de um hidrociclone) estará conectado externamente a BRT-10003 para reter as células. Estas são concentradas na corrente de saída de *underflow* e recirculadas para BRT-10003. A corrente de saída de *overflow*, que contém o fator IX recombinante e é praticamente isenta de células, é encaminhada para o tanque de equalização TQE-10001 para depois seguir para a área de purificação.

O hidrociclone possui as seguintes características de projeto:

- **Eficiência total ou eficiência de separação celular (E)** – Se refere ao número de células recolhidas no *underflow* e é representada pela equação (2):

$$E = \frac{Q_u X_u}{QX} \quad (2)$$

Na equação (1), Q_u , Q , X_u e X são as vazões volumétricas e as concentrações celulares no *underflow* e na alimentação, respectivamente.

- **Razão de fluido (R_f)** – É a fração de fluido reportada ao *underflow*. Para suspensões diluídas o R_f pode ser representado pela equação (3):

$$R_f \cong \frac{Q_u}{Q} \quad (3)$$

- **Eficiência de separação reduzida (E')** – Se refere às células que serão ou não separadas devido à intensidade do campo centrífugo e pode ser representada pela equação (4):

$$E' = \frac{E - R_f}{1 - R_f} \cong 1 - \frac{X_o}{X} \quad (4)$$

Na equação (4), X_o é a concentração celular no *overflow*.

O critério utilizado para a escolha do hidrociclone, dentre os diferentes modelos testados por foi o de maior eficiência total reduzida, associado a um bom valor de vazão de *overflow* e de eficiência total. Altos valores de eficiência são necessários para se atingir elevadas concentrações celulares no biorreator de perfusão e altas vazões de *overflow* minimizam o número de hidrociclones necessários para operar como dispositivos de separação celular de biorreatores de grande volume.

Foi escolhido o hidrociclone identificado no artigo como HC2015 ^[18], cuja configuração é mostrada na Tabela 19.

Tabela 19 – Caracterização da Configuração do Hidrociclone HC2015 em Δp de 1,0 bar ^[18].

Parâmetro	Valor
Vazão de alimentação (L/min)	1,2
Razão de fluido (R_f) (%)	75,3
Vazão de <i>overflow</i> ($Q_o=Q(1-R_f)$) (L/min)	0,30
Eficiência total (E) (%)	97,4
Eficiência total reduzida (E') (%)	89,5
Diâmetro do corpo (D_c) (mm)	10
Diâmetro do <i>underflow</i> (D_u) (mm)	2
Diâmetro do <i>overflow</i> (D_o) (mm)	1,5

Para cálculo do número de hidrociclones necessários ao processo, é preciso levar em consideração que a taxa de perfusão de BRT-10003 é de 2 vvd (volume de meio / volume de reator / dia). Sendo que a cada batelada serão produzidos 147 L de solução contendo fator IX recombinante, ao longo de um dia, esse volume é de 294 L. Dessa maneira, a vazão de produção de fator IX é de 294 L/dia (0,20 L/min) e, como dito anteriormente, esta é a vazão de *overflow* do hidrociclone (ou vazão total de *overflow* da bateria de hidrociclones).

Como mostra a Tabela 2, a vazão de *overflow* de HC2015 é de 0,30 L/min, que é menor que a vazão de *overflow* necessária ao processo. Sendo assim, será necessário somente um hidrociclone cuja vazão de alimentação Q , calculada pela equação (5), será de 0,83 L/min (49,6 L/h).

$$Q\left(\frac{L}{\text{min}}\right) = \frac{R_f}{1 - Q_o} \quad (5)$$

O hidrociclone a ser utilizado está ilustrado na Figura 33.

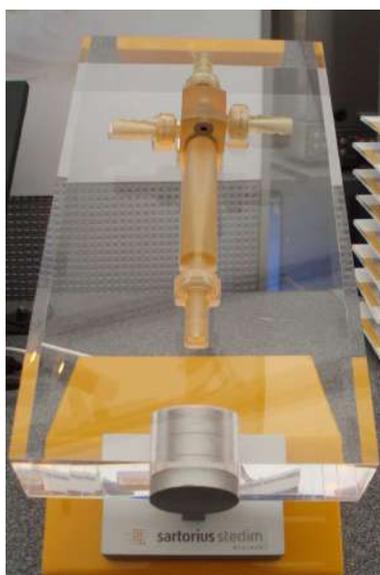


Figura 33. Hidrociclone HC2015.

5.4.1 Folha de Especificações de HCL-100001

A Folha de Especificações 04 mostra as principais características de HCL-10001.

Folha de Especificações 04 –HCL-10001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	10 – Cultivo Celular
TAG	HCL-10001
Nº de Ordem	001
Descrição	Hidrociclone
Serviço	Separação de Células para Reciclo a BRT-10001
P&ID	DE-10-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-10-007	CC-10-008
	PB-10-008
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Fabricante	Sartorius Stedim
Material	Aço INOX 316
Revestimento Interno	Polímero Especial
ΔP de Operação (bar)	1,00
Vazão de Alimentação (L/h)	49,6
Vazão de <i>Overflow</i> (L/h)	12,2
Razão de fluido (%)	75,3
Eficiência Total (%)	97,4
Eficiência Total Reduzida (%)	89,5
Diâmetro do Corpo (mm)	10
Diâmetro do <i>Overflow</i> (mm)	2
Diâmetro do <i>Underflow</i> (mm)	1,5

5.5 TQE-10001: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-10001, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume do meio de cultivo do fator IX produzido em um dia para que este seja encaminhado para a área de purificação.

Sendo assim, seu volume operacional é de 294 litros e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-10001 será de 330 litros. A equação (6) mostra o cálculo do volume de projeto do tanque:

$$\text{Volume de Projeto do Tanque (L)} = \frac{\text{Volume Operacional do Tanque(L)}}{\% \text{ utilizada do Tanque}} \quad (6)$$

5.5.1 Folha de Especificações de TQE-10001

A Folha de Especificações 05 mostra as principais características de TQE-10001.

Folha de Especificações 05 – TQE-10001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	10 – Cultivo Celular
TAG	TQE-10001
Nº de Ordem	001
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Meio de Cultivo Contendo Fator IX Produzido em 1 dia para Alimentação de MFL-20001
P&ID	DE-10-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-10-009	PB-10-010
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	12,2
Vazão de Descarga (L/h)	147,0
Volume (L)	330

5.6 MFL-20001: Sistema de Microfiltração

O sistema de microfiltração MFL-20001 foi projetado para remover as células do meio de cultivo contendo o fator IX utilizando membranas com tamanho de poro de aproximadamente 0,6 μm ^[47] com fluxo de entrada tangencial à membrana. Dessa maneira, as células ficam retidas na membrana.

Para dimensionamento do sistema de microfiltração, serão utilizados os dados presentes na Tabela 20.

Tabela 20 – Dados para o Dimensionamento de MFL-20001.

Parâmetro	Valor
Volume de Alimentação (L)	293,9
Tempo (h) (*)	2
Fluxo de Permeado (L/ h m ²) [56]	110
Pressão Transmembrana (bar) [56]	0,5
Volume de Concentrado em Relação à Alimentação (%) (**)	10

(*) Dado de Projeto

(**) Dado do Fabricante

O tempo foi escolhido baseado no tempo global do processo, de modo que este não ultrapasse 24 h e também para fornecer um valor razoável para a área da membrana, uma vez que, quanto menor o tempo para realizar a filtração desejada, maior a área necessária. Áreas de membrana não devem ser utilizadas, a não ser que seja extremamente necessário, uma vez que pode ser grande a perda de produto por aderência nos poros da membrana.

Com os valores do tempo e volume de concentrado em relação à alimentação, é possível calcular as vazões de alimentações, de concentrado e de permeado, e os volumes de concentrado e permeado. As equações para esse cálculo se encontram no Anexo 9.3.

Com os valores do fluxo de permeado à pressão de transmembrana e tempo é possível calcular a área da membrana necessária à microfiltração pela equação (7):

$$A(m^2) = \frac{\text{Volume permeado (L)}}{\text{Fluxo permeado} \left(\frac{L}{h m^2} \right) * \text{tempo}(h)} \quad (7) \quad [55]$$

Os parâmetros de dimensionamento do sistema de microfiltração MFL-20001 calculados estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Parâmetros de Dimensionamento de MFL-20001.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	147,0
Vazão de Concentrado (L/h)	6,4
Vazão de Permeado (L/h)	140,6
Volume de Concentrado (L)	12,7
Volume de Permeado (L)	281,2
Área da Membrana (m ²)	1,3

O sistema é composto por um módulo de membranas de microfiltração de 1,3 m² que deve ser substituído duas vezes ao ano, segundo recomendação do fabricante.

A limpeza das membranas é realizada após cada operação com solução 0,1M de NaOH por 1 hora ^[57].

Como o rendimento da microfiltração é de 95 %, a massa de fator IX recombinante ativo presente no permeado de MFL-20001 é de 94,94 g.

A Figura 34 esquematiza um módulo de membranas com alimentação axial.

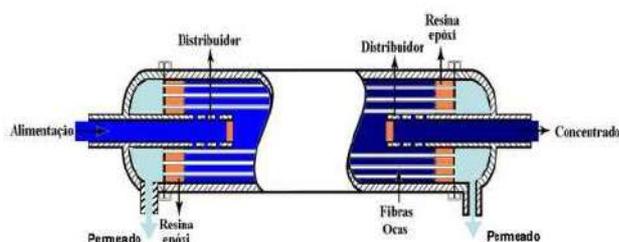


Figura 34. Módulo de Membranas com Alimentação Axial. ^[54]

A Figura 35 ilustra um sistema de membranas industrial.



Figura 34. Sistema de Membranas Industrial. ^[54]

5.6.1 Folha de Especificações de MFL-20001

A Folha de Especificações 06 mostra as principais características de MFL-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	MFL-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Sistema de Microfiltração
Serviço	Separação de Células do Meio de Cultivo Contendo Fator IX
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-10-010	PB-20-001
	CC-20-101
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Fabricante	PamMembranas
Material	Aço INOX 316
Tempo de Operação (h)	2
Pressão Transmembrana de Operação (bar)	0,5
Fluxo de Permeado (L/h m ²)	110
Área da Membrana (m ²)	1,3
Vazão de Alimentação (L/h)	147,0
Vazão de Concentrado (L/h)	6,4
Vazão de Permeado (L/h)	140,6
Diâmetro Médio de Poro da Membrana (µm)	0,6

5.7 TQE-20001: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20001, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume de permeado proveniente de MFL-20001.

Sendo assim, seu volume operacional é de 281 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-20001 será de 320 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.7.1 Folha de Especificações de TQE-20001

A Folha de Especificações 07 mostra as principais características de TQE-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Permeado de MFL-20001 para Alimentação de UFL-20001 e Troca de Tampão com TQD-20001
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-20-001	PB-20-002
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	147,0
Vazão de Descarga (L/h)	147,0
Volume (L)	320

5.8 TQD-20001: Tanque de Dialisante

Após a microfiltração, será realizada uma etapa de ultra/diafiltração. A ultrafiltração tem como objetivo concentrar a solução de permeado advinda de MFL-20001- meio de cultivo contendo fator IX livre de células - e a operação sob o modo de diafiltração é utilizada para ajustar o tampão para aplicação desta solução em CTA-20001.

O tanque de dialisante TQD-20001 foi projetado para armazenar o volume de solução dialisante necessário para a troca de tampão. A solução armazenada em TQD-20001 é a mesma solução da etapa de equilíbrio de CTA-20001, sendo sua composição 50 mM de TRIS e 150 mM de NaCl, com pH igual a 8,0.

A diafiltração estará completa quando 5 volumes de concentrado de UFL-20001 – solução de fator IX concentrada – de solução tampão presente em TQD-20001 passarem através da membrana, o que resulta em uma remoção teórica de aproximadamente 99% de sais e outros componentes de baixo peso molecular presentes no permeado de MFL-20001.

Como será visto no dimensionamento de UFL-20001, o volume de concentrado é de 14 L, sendo o volume de solução dialisante necessária para troca de tampão de 70 L. Utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQD-20001 será de 80 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

A diafiltração será operada a volume constante de concentrado, sendo a vazão de solução dialisante misturada ao concentrado a mesma vazão do permeado que deixa UFL-20001, que é de 133,6 L/h.

Como o volume de solução dialisante é de 70 L e vazão com que deixa o tanque é de 133,6 L/h, o tempo de operação de TQD-20001 é de 0,53 h, sendo também o tempo que UFL-20001 opera em modo de diafiltração. Como este tempo não é utilizado para o dimensionamento do sistema de ultrafiltração, este está sendo contabilizado no tempo global de operação da planta como tempo de operação do tanque de dialisante.

5.8.1 Folha de Especificações de TQD-20001

A Folha de Especificações 08 mostra as principais características de TQD-20001.

Folha de Especificações 08 – TQD-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQD-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Tanque de Dialisante
Serviço	Troca de Tampão do Fator IX para Purificação em CTA-20001
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
ST-20-102	ST-20-103
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Descarga (L/h)	133,6
Volume (L)	80
Tempo de operação (h)	0,53

5.9 UFL-20001: Sistema de Ultrafiltração

O sistema de ultrafiltração UFL-20001 foi projetado para concentrar em vinte vezes o volume (*20-fold*)^[47] do meio de cultivo contendo fator IX utilizando membranas com tamanho de corte de 10 kDa. Como o fator IX recombinante tem peso molecular de 55 kDa, este ficará retido na membrana.

Para dimensionamento do sistema de ultrafiltração, serão utilizados os dados presentes na Tabela 22.

Tabela 22 – Dados para o Dimensionamento de UFL-20001.

Parâmetro	Valor
Volume de Alimentação (L)	281,2
Tempo (h) (*)	2
Fluxo de Permeado (L/ h m ²) [58]	51
Delta P na membrana (bar) [58]	1
Volume de Concentrado em Relação à Alimentação (%) [47]	20

(*) Dado de Projeto

O tempo foi dimensionado pelo mesmo critério utilizado no dimensionamento de MFL-20001.

Com os valores do tempo e volume de concentrado em relação à alimentação, é possível calcular as vazões de alimentações, de concentrado e de permeado, e os volumes de concentrado e permeado. As equações para esse cálculo se encontram no Anexo 9.3.

Com os valores do fluxo de permeado à pressão de transmembrana e tempo é possível calcular a área da membrana necessária à ultrafiltração pela equação (4), descrita no tópico 5.6.

Os parâmetros de dimensionamento do sistema de ultrafiltração UFL-20001 calculados estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20001.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	140,6
Vazão de Concentrado (L/h)	7,0
Vazão de Permeado (L/h)	133,6
Volume de Concentrado (L)	14,0
Volume de Permeado (L)	267,2
Área da Membrana (m ²)	2,6

O sistema é composto por um módulo de membranas de ultrafiltração de 2,6 m² que deve ser substituído duas vezes ao ano, segundo recomendação do fabricante.

A limpeza das membranas é realizada após cada operação com solução 0,1M de NaOH por 1 hora [57].

Como o rendimento da ultrafiltração é de 95 %, a massa de fator IX recombinante ativo presente no concentrado de UFL-20001 é de 90,19 g.

5.9.1 Folha de Especificações de UFL-20001

A Folha de Especificações 09 mostra as principais características de UFL-20001.

Folha de Especificações 09 – UFL-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	UFL-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Módulo de Ultrafiltração
Serviço	Concentração do Fator IX para Purificação em CTA-20001
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-20-002	PB-20-003
	PB-20-004
	RJ-20-104
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Fabricante	PamMembranas
Material	Aço INOX 316
Tempo de Operação (h)	2
Pressão Transmembrana de Operação (bar)	1
Fluxo de Permeado (L/h m ²)	51
Área da Membrana (m ²)	2,6
Vazão de Alimentação (L/h)	140,6
Vazão de Concentrado (L/h)	7,0
Vazão de Permeado (L/h)	133,6
Tamanho de Corte (kDa)	10

5.10 TQE-20002: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20002, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume de concentrado proveniente de UFL-20001.

Sendo assim, seu volume operacional é de 14 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-20002 será de 20 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.10.1 Folha de Especificações de TQE-20002

A Folha de Especificações 10 mostra as principais características de TQE-20002.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20002
Nº de Ordem	002
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Concentrado de UFL-20001 para Alimentação de CTA-20001
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-20-004	PB-20-005
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	7,0
Vazão de Descarga (L/h)	61,6
Volume (L)	20

5.11 CTA-20001: Coluna de Troca Aniônica

Esse processo de cromatografia utiliza a resina de troca aniônica forte Q-Sepharose Fast Flow, da GE HealthCare. Proteínas ácidas, tais quais o fator IX, e outras substâncias poli-iônicas carregadas negativamente no pH de operação da coluna se ligam à resina por interações eletrostáticas. Os compostos ligados à resina são eluídos diferentemente por quebra das interações eletrostáticas com o aumento da condutividade. No entanto, esse processo de purificação do fator IX recombinante utiliza a resina em um modo de pseudo-afinidade, pois o fator é eluído dela com uma solução diluída de cloreto de cálcio (CaCl_2). A inclusão do CaCl_2 no tampão de eluição gera uma mudança conformacional no fator IX que resulta na sua eluição da resina.

A principal função dessa etapa de purificação é remover os contaminantes básicos e neutros da solução contendo o fator IX, que não se ligam à resina durante a aplicação da amostra – concentrado advindo de UFL-20001 –, remover as proteínas ácidas que se ligam à resina mas não são eluídas pelo tampão contendo CaCl_2 , sendo que nessas proteínas se enquadram as formas inativas de fator IX e para fornecer uma alimentação adequada à coluna CAF-20001.

Em colunas de cromatografia são realizadas as seguintes etapas:

- **Equilíbrio** – Tem o objetivo de ajustar o pH e/ou força iônica da coluna. A coluna é considerada em equilíbrio quando os valores de pH e condutividade não mais se alterarem.

- **Aplicação da amostra** – É realizada com uma velocidade superficial apropriada com o objetivo de maximizar o rendimento do processo e minimizar o tempo de operação.
- **Lavagem** – É realizada com um tampão de maior força iônica que o tampão de equilíbrio para que as proteínas menos fortemente ligadas à resina eluam antes da proteína de interesse.
- **Eluição** – É realizada com uma solução de força iônica determinada previamente, capaz de eluir a proteína de interesse.
- **Regeneração** – Tem como objetivo eluir da resina substâncias que possam ter ficado ligadas nela após a eluição por aplicação de solução com alta força iônica.
- **Sanitização** – Tem como objetivo evitar crescimento de microorganismos na coluna.
- **Cleaning-in-Place (CIP)** – Tem como objetivo a remoção de substâncias que possam ter ficado mais fortemente ligadas à resina que não sejam eluídas com a regeneração. Geralmente é realizada uma vez a cada cinco ciclos de operação da coluna.
- **Manutenção** – É realizada após o uso da coluna e tem como objetivo conservá-la. No caso da purificação do fator IX, em que é realizado um ciclo de cromatografia por dia, a manutenção será feita com a solução de equilíbrio da coluna até o dia seguinte.

Em CTA-20001 a lavagem é feita em duas etapas: a primeira, para garantir que toda a alimentação passou através da coluna e as impurezas da carga, assim como os contaminantes fracamente ligados à resina sejam lavadas do sistema; a segunda, para diminuir a condutividade em preparação para a eluição.

Para dimensionar o volume de resina necessário a essa etapa de cromatografia deve-se considerar que a massa de fator IX recombinante ativo que é alimentada na coluna é de 90,19 g e que a capacidade de adsorção de fator IX ativo na resina é de 35g/ L de resina ^[59]. Dessa maneira, o volume operacional de resina, calculado pela equação (8) é de 2,6 L e, considerando que somente seria utilizado 80% do volume da resina para garantir máxima ligação do fator com a resina, o volume de resina de projeto é de 3,2 L.

$$\text{Volume de resina(L)} = \frac{\text{massa de fator IX ativo(g)}}{\text{Capacidade de adsorção } (\frac{\text{g}}{\text{L}})} \quad (8)$$

Com o volume de resina de projeto é possível dimensionar o diâmetro, altura do leito e altura da coluna pela fichas técnicas de colunas cromatográficas disponíveis no mercado. Para o dimensionamento de CTA-10001 foi escolhida a família de colunas BPG, da GE HealthCare, que está ilustrada na Figura 35.



Figura 35. Família de Colunas BPG, da GE HealthCare [Catálogo do Fabricante].

Pelo volume de resina de projeto é possível selecionar, no catálogo do fabricante, o modelo da coluna que tem tal capacidade. Dessa maneira, tem-se o diâmetro e a altura da coluna, que são especificados em cada modelo. Com o diâmetro da coluna e o volume de resina, calcula-se a altura do leito. Com esse valor, é possível confirmar se a coluna escolhida é realmente a desejada, pois cada modelo possui altura mínima e máxima do leito.

Para um volume de resina de projeto de 3,2 L, foi selecionada a coluna BPG 140/500, que tem 14 cm de diâmetro de 50 cm de altura. A altura do leito calculada foi de 21,0 cm, que está dentro da faixa admitida pela coluna.

Para a coluna BPG 140/500 é utilizado o sistema cromatográfico AKTApocess, do mesmo fabricante, projetado para processos de produção de biofármacos em larga escala. Esse sistema etapa ilustrado na Figura 36.



Figura 36. Sistema Cromatográfico AKTApurify, da GE HealthCare [Catálogo do Fabricante]

É importante ressaltar que a resina deve ser substituída a cada 150 ciclos de cromatografia [15].

No catálogo da resina Q-Sepharose Fast Flow, é fornecida uma faixa de velocidade na qual as corridas deveriam ocorrer. Foi escolhida como velocidade 400 cm/h, que quando multiplicada pela área da seção reta da coluna ($\pi D^2/4$), fornece o valor da vazão volumétrica da coluna, que é de 62,6 L/h. Também no catálogo da resina é explicitado que a velocidade para procedimentos de limpeza – CIP e sanitização – a velocidade deveria ser de 40 cm/h.

A Tabela 24, esquematizada segundo Silveira, Petrocínio e Braga [15], mostra, para cada etapa da cromatografia, a composição da solução tampão e quantos volumes desta necessitam ser utilizados na coluna.

Tabela 24 – Volume do Leito e Composição da Solução Tampão de cada Etapa de CTA-20001.

Etapa do Processo		Volumes do Leito	Solução Tampão Utilizada
Equilíbrio [47]		5	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH=8,0
Lavagem [47]	1ª Etapa	3	50 mM TRIS, 200 mM NaCl, pH=8,0
	2ª Etapa	2	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH=8,0
Eluição [47]		5	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ , pH=8,0
Regeneração (*)		5	2 M NaCl
CIP (*)	1ª Etapa	0,5	2 M NaCl
	2ª Etapa	3	1 M NaOH
	3ª Etapa	3	Etanol (70%) ou Isopropanol (30%)
Sanitização (*)		1,5	1 M NaOH

(*)Catálogo do Fabricante da Resina.

Com o número de volumes do leito e o volume de projeto da coluna, é possível saber o volume de solução tampão de cada etapa e, com este valor dividido pela vazão da etapa, é possível

calcular o tempo de cada uma. Na Tabela 25 estão presentes os valores do volume e tempo de cada etapa. Também é calculada a soma dos tempos de aplicação da amostra, lavagem e eluição, pois esta soma é o tempo gasto durante o processo de purificação do fator IX, uma vez que as demais etapas podem ser realizadas ao mesmo tempo de outros processos. A Tabela 25 também o tempo total de um ciclo de cromatografia com CIP e o tempo das demais etapas, considerado tempo para manutenção da coluna.

Tabela 25 – Volume e Tempo de cada Etapa de CTA-20001.

Etapa do Processo		Volume (L)	Tempo (h)
Aplicação da Amostra		14,1	0,23
Equilíbrio		16,1	0,26
Lavagem	1ª Etapa	9,7	0,16
	2ª Etapa	6,4	0,10
Eluição		16,1	0,26
Regeneração		16,1	0,26
CIP	1ª Etapa	1,6	0,26
	2ª Etapa	9,7	1,57
	3ª Etapa	9,7	1,57
Sanitização		4,8	0,78
Tempo aplicação + lavagem + eluição			0,75
Tempo Total de 1 Ciclo com CIP			5,46
Tempo para manutenção			4,71

Em CTA-20001, como o rendimento é de 90%, a massa de fator IX ativo presente no eluído é de 81,17 g. O eluído será alimentado em TQE-20003, que alimentará CAF-20001.

5.11.1 Folha de Especificações de CTA-20001

A Folha de Especificações 11 mostra as principais características de CTA-20001.

Folha de Especificações 11 – CTA-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	CTA-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Coluna de Troca Aniônica
Serviço	1ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PB-20-005	PB-20-006
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	BPG 140/500
Fabricante	GE HealthCare
Material	Vidro
Resina	Q-Sepharose-FF
Sistema Cromatográfico	AKTAprocess
Volume de Resina (L)	3,2
Diâmetro (cm)	14
Altura (cm)	50
Altura do Leito (cm)	21,0
Dimensão na Planta – L x C x H (cm)	59 x 59 x 127
Peso (kg)	25
Vazão de Operação (L/h)	61,6
Tempo de Aplicação da Amostra, Lavagem e Eluição (h)	0,75
Tempo Total de um Ciclo, com CIP (h)	5,46

5.12 TQE-20003: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20003, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume de efluído proveniente de CTA-20001.

Sendo assim, seu volume operacional é de 16 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-20002 será de 20 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.12.1 Folha de Especificações de TQE-20003

A Folha de Especificações 12 mostra as principais características de TQE-20003.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20003
Nº de Ordem	003
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Eluído de CTA-20001 para Alimentação de CAF-20001
P&ID	DE-20-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-006	PP-20-007
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	61,6
Vazão de Descarga (L/h)	103,2
Volume (L)	20

5.13 CAF-20001: Coluna de Afinidade

Esse processo de cromatografia utiliza a resina Matrex Cellufine Sulfate, da Millipore. Como essa resina é análoga à heparina imobilizada, pode ser utilizada em purificação de afinidade de proteínas que contenham sítios de ligação com a heparina. Ela também pode ser utilizada em cromatografia de troca catiônica devido à carga negativa pela presença do sulfato. Proteínas básicas, outras substâncias poli-iônicas carregadas positivamente no pH de operação da coluna e proteínas que possuem sítios de ligação com a heparina se ligam à resina e são eluídas por solução de força iônica crescente da resina.

Essa etapa de purificação é realizada para remover proteínas das células hospedeiras eluídas junto com o fator IX ativo em CTA-20001 e ajustar o tampão para fornecer alimentação adequada a CTA-20002.

Nessa cromatografia, são realizadas as mesmas etapas de CTA-20001.

É feita uma lavagem para garantir que toda a alimentação passou através da coluna e que impurezas fracamente ligadas à resina sejam removidas do sistema. Pode ser realizada uma segunda lavagem para remover íons de cálcio antes da eluição.

Para dimensionar o volume de resina necessário a essa etapa de cromatografia deve-se considerar que a massa de fator IX recombinante ativo que é alimentada na coluna é de 81,17 g e que a capacidade de adsorção de fator IX ativo na resina é de 3 g/ L de resina ^[60]. Dessa maneira, o volume operacional de resina, calculado pela equação (8), descrita no tópico 5.11 é de 27,1 L e,

considerando que somente seria utilizado 80% do volume da resina para garantir máxima ligação do fator com a resina, o volume de resina de projeto é de 33,8 L.

Com o volume de resina de projeto é possível dimensionar o diâmetro, altura do leito e altura da coluna pela fichas técnicas de colunas cromatográficas disponíveis no mercado. Para o dimensionamento de CAF-10001 também foi escolhida a família de colunas BPG, da GE HealthCare.

Pelo volume de resina de projeto é possível selecionar, no catálogo do fabricante, o modelo da coluna que tem tal capacidade. Dessa maneira, tem-se o diâmetro e a altura da coluna, que são especificados em cada modelo. Com o diâmetro da coluna e o volume de resina, calcula-se a altura do leito. Com esse valor, é possível confirmar se a coluna escolhida é realmente a desejada, pois cada modelo possui altura mínima e máxima do leito.

Para um volume de resina de projeto de 33,8 L, foi selecionada a coluna BPG 300/950, que tem 29,6 cm de diâmetro de 95 cm de altura. A altura do leito calculada foi de 49,2 cm, que está dentro da faixa admitida pela coluna.

Para a coluna BPG 300/950 é utilizado o sistema cromatográfico AKTAprocess, do mesmo fabricante.

É importante ressaltar que a resina deve ser substituída a cada 150 ciclos de cromatografia [15].

No catálogo da resina Matrex Cellufine Sulfate, é fornecida uma faixa de velocidade na qual as corridas deveriam ocorrer. Foi escolhida como velocidade 150 cm/h, que quando multiplicada pela área da seção reta da coluna ($\pi D^2/4$), fornece o valor da vazão volumétrica da coluna, que é de 103,2 L/h.

A Tabela 26, esquematizada segundo Silveira et al. [15], mostra, para cada etapa da cromatografia, a composição da solução tampão e quantos volumes desta necessitam ser utilizados na coluna.

Tabela 26 – Volume do Leito e Composição da Solução Tampão de cada Etapa de CAF-20001.

Etapa do Processo		Volumes do Leito	Tampão Utilizado
Equilíbrio [47]		3	50 mM TRIS, pH =8,0
Lavagem [47]		3	50 mM TRIS, 150mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ , pH=8,0
Eluição [47]		5	50 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH=8,0
Regeneração (*)		3	0,1 M NaOH
CIP (*)	1ª Etapa	0,5	2 M NaCl
	2ª Etapa	2	8 M uréia
	3ª Etapa	4	Etanol (70%)
Sanitização (*)		1,5	0,1 M NaOH, 20% etanol

(*)Catálogo do Fabricante da Resina.

Com o número de volumes do leite e o volume de projeto da coluna, é possível saber o volume de solução tampão de cada etapa e, com este valor dividido pela vazão da etapa, é possível calcular o tempo de cada uma. Na Tabela 27 estão presentes os valores do volume e tempo de cada etapa. Também é calculada a soma dos tempos de aplicação da amostra, lavagem e eluição, pois esta soma é o tempo gasto durante o processo de purificação do fator IX, uma vez que as demais etapas podem ser realizadas ao mesmo tempo de outros processos. A Tabela 27 também o tempo total de um ciclo de cromatografia com CIP e o tempo das demais etapas, considerado tempo para manutenção da coluna.

Tabela 27 – Volume e Tempo de cada Etapa de CAF-20001.

Etapa do Processo		Volume (L)	Tempo (h)
Aplicação da Amostra		16,1	0,16
Equilíbrio		101,5	0,98
Lavagem		101,5	0,98
Eluição		169,1	1,64
Regeneração		101,5	0,98
CIP	1ª Etapa	16,9	0,16
	2ª Etapa	67,6	0,66
	3ª Etapa	135,3	1,31
Sanitização		50,7	0,49
Tempo aplicação + lavagem + eluição			2,78
Tempo Total de 1 Ciclo com CIP			7,36
Tempo para manutenção			4,59

Em CAF-20001, como o rendimento é de 90%, a massa de fator IX ativo presente no eluído é de 73,06 g. O eluído será alimentado em TQE-20004, que alimentará CTA-20002.

5.13.1 Folha de Especificações de CAF-20001

A Folha de Especificações 13 mostra as principais características de CAF-20001.

Folha de Especificações 12 – CAF-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	CAF-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Coluna de Afinidade
Serviço	2ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-007	PP-20-008
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	BPG 300/950
Fabricante	GE HealthCare
Material	Vidro
Resina	Matrex Cellufine Sulfate
Sistema Cromatográfico	AKTAprocess
Volume de Resina (L)	33,8
Diâmetro (cm)	29,6
Altura (cm)	95
Altura do Leito (cm)	49,2
Dimensão na Planta – L x C x H (cm)	69 x 69 x 178
Peso (kg)	78
Vazão de Operação (L/h)	103,2
Tempo de Aplicação da Amostra, Lavagem e Eluição (h)	2,78
Tempo Total de um Ciclo, com CIP (h)	7,36

5.14 TQE-20004: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20004 foi projetado para armazenar todo o volume de eluído proveniente de CAF-20001 e ajustar o pH de 8,0 para 7,2 ^[47] para alimentação de CTA-20002 com solução diluída de HCl.

Realizando os cálculos para obtenção da solução com pH adequado, o volume operacional do tanque é de 169 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque em torno de 80% por este possuir agitação para realizar a mistura, o volume de projeto de TQE-20004 será de 210 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.14.1 Folha de Especificações de TQE-20004

A Folha de Especificações 14 mostra as principais características de TQE-20004.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20004
Nº de Ordem	004
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Eluído de CAF-20001 e Troca de Tampão para Alimentação de CTA-20002
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-008	PP-20-009
ST-20-105	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Vazão de Alimentação (L/h)	103,2
Vazão de Descarga (L/h)	103,2
Volume (L)	210

5.15 CTA-20002: Coluna de Troca Aniônica

Esse processo de cromatografia utiliza a resina Ceramic Hydroxyapatite, da Bio-Rad, que separa proteínas com alta faixa de cargas e pontos isoelétricos por interação eletrostática. O fator IX é uma proteína ácida que se liga à resina em pH aproximadamente neutro. Proteínas ácidas são eluídas da resina com a adição de fosfato à solução tampão. A concentração de fosfato varia de acordo com as propriedades da molécula de interesse, o que permite eluições diferenciais para as proteínas ligadas à resina.

Essa etapa de purificação é realizada para remover fator IX inativo e outros contaminantes eluídos junto com o fator IX ativo em CAF-20001 e ajustar o tampão para fornecer alimentação adequada a CAM-20001, que é uma coluna com metal imobilizado, uma vez que TRIS, histidina e glicina não são compatíveis por romper a interação de ligação do metal imobilizado.

Nessa cromatografia, são realizadas as mesmas etapas de CTA-20001.

Também são feitas duas lavagens: a primeira, para garantir que toda a alimentação passou através da coluna e que impurezas fracamente ligadas à resina sejam removidas do sistema; a segunda, para remover formas inativas de fator IX.

Para dimensionar o volume de resina necessário a essa etapa de cromatografia deve-se considerar que a massa de fator IX recombinante ativo que é alimentada na coluna é de 73,06 g e que a capacidade de adsorção de fator IX ativo na resina é de 6 g/ L de resina (relação com

resultados de capacidades entre as resinas utilizadas nessa cromatografia e em CFA-20001. Dessa maneira, o volume operacional de resina, calculado pela equação (8), descrita no tópico 5.11, é de 12,2 L e, considerando que somente seria utilizado 80% do volume da resina para garantir máxima ligação do fator com a resina, o volume de resina de projeto é de 15,2 L.

Com o volume de resina de projeto é possível dimensionar o diâmetro, altura do leito e altura da coluna pela fichas técnicas de colunas cromatográficas disponíveis no mercado. Para o dimensionamento de CTA-10002 também foi escolhida a família de colunas BPG, da GE HealthCare.

Pelo volume de resina de projeto é possível selecionar, no catálogo do fabricante, o modelo da coluna que tem tal capacidade. Dessa maneira, tem-se o diâmetro e a altura da coluna, que são especificados em cada modelo. Com o diâmetro da coluna e o volume de resina, calcula-se a altura do leito. Com esse valor, é possível confirmar se a coluna escolhida é realmente a desejada, pois cada modelo possui altura mínima e máxima do leito.

Para um volume de resina de projeto de 15,2 L, foi selecionada a coluna BPG 300/500, que tem 29,6 cm de diâmetro de 50 cm de altura. A altura do leito calculada foi de 22,1 cm, que está dentro da faixa admitida pela coluna.

Para a coluna BPG 300/500 é utilizado o sistema cromatográfico AKTAprocess, do mesmo fabricante.

É importante ressaltar que a resina deve ser substituída a cada 150 ciclos de cromatografia [15].

No catálogo da resina Ceramic Hydroxyapatite, é fornecida uma faixa de velocidade na qual as corridas deveriam ocorrer. Foi escolhida como velocidade 150 cm/h, que quando multiplicada pela área da seção reta da coluna ($\pi D^2/4$), fornece o valor da vazão volumétrica da coluna, que é de 103,2 L/h.

A Tabela 28, esquematizada segundo Silveira et al. [15], mostra, para cada etapa da cromatografia, a composição da solução tampão e quantos volumes desta necessitam ser utilizados na coluna.

Tabela 28 – Volume do Leito e Composição da Solução Tampão de cada Etapa de CTA-20002.

Etapa do Processo		Volumes do Leito	Tampão Utilizado
Equilíbrio ^[47]		3	50 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH =7,5
Lavagem ^[47]	1ª Etapa	3	0,5 M NaCl, 50 mM TRIS, pH =7,5
	2ª Etapa	2	50 mM K ₂ HPO ₄ , 185 mM NaCl, pH=7,2
Eluição ^[47]		5	500 mM K ₂ HPO ₄ , 200 mM NaCl, pH=7,2
Regeneração ^(*)		4	500 mM KH ₂ PO ₄
CIP ^(*)	1ª Etapa	4	400 mM Na ₃ PO ₄ (pH 11-12)
	2ª Etapa	3	2 M NaCl
	3ª Etapa	3	6 M uréia
Sanitização ^(*)		3	2 M NaOH

(*)Catálogo do Fabricante da Resina.

Com o número de volumes do leito e o volume de projeto da coluna, é possível saber o volume de solução tampão de cada etapa e, com este valor dividido pela vazão da etapa, é possível calcular o tempo de cada uma. Na Tabela 29 estão presentes os valores do volume e tempo de cada etapa. Também é calculada a soma dos tempos de aplicação da amostra, lavagem e eluição, pois esta soma é o tempo gasto durante o processo de purificação do fator IX, uma vez que as demais etapas podem ser realizadas ao mesmo tempo de outros processos. A Tabela 29 também o tempo total de um ciclo de cromatografia com CIP e o tempo das demais etapas, considerado tempo para manutenção da coluna.

Tabela 29 – Volume e Tempo de cada Etapa de CTA-20002.

Etapa do Processo		Volume (L)	Tempo (h)
Aplicação da Amostra		169,1	1,64
Equilíbrio		45,7	0,44
Lavagem	1ª Etapa	45,7	0,44
	2ª Etapa	30,4	0,29
Eluição		76,1	0,74
Regeneração		60,9	0,59
CIP	1ª Etapa	60,9	0,59
	2ª Etapa	45,7	0,44
	3ª Etapa	45,7	0,44
Sanitização		45,7	0,44
Tempo aplicação + lavagem + eluição			3,11
Tempo Total de 1 Ciclo com CIP			6,06
Tempo para manutenção			2,95

Em CTA-20002, como o rendimento é de 90%, a massa de fator IX ativo presente no eluído é de 65,75 g. O eluído será alimentado em TQE-20005, que alimentará CAM-20001.

5.15.1 Folha de Especificações de CTA-20002

A Folha de Especificações 15 mostra as principais características de CTA-20002.

Folha de Especificações 15 – CTA-20002

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	CTA-20002
Nº de Ordem	002
Descrição	Coluna de Troca Aniônica
Serviço	3ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-009	PP-20-010
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	BPG 300/500
Fabricante	GE HealthCare
Material	Vidro
Resina	Ceramic Hydroxyapatite
Sistema Cromatográfico	AKTAprocess
Volume de Resina (L)	15,2
Diâmetro (cm)	29,6
Altura (cm)	50
Altura do Leito (cm)	22,1
Dimensão na Planta – L x C x H (cm)	69 x 69 x 133
Peso (kg)	68
Vazão de Operação (L/h)	103,2
Tempo de Aplicação da Amostra, Lavagem e Eluição (h)	3,11
Tempo Total de um Ciclo, com CIP (h)	6,06

5.16 TQE-20005: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20005, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume de efluído proveniente de CTA-20002.

Sendo assim, seu volume operacional é de 76 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-20005 será de 85 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.16.1 Folha de Especificações de TQE-20005

A Folha de Especificações 16 mostra as principais características de TQE-20005.

Folha de Especificações 16 – TQE-20006

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20005
Nº de Ordem	005
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Eluído de CTA-20002 para Alimentação de CAM-20001
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-010	PP-20-011
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	103,2
Vazão de Descarga (L/h)	1178,1
Volume (L)	85

5.17 CAM-20001: Coluna de Afinidade com Metal Imobilizado

Esse processo de cromatografia utiliza a resina Fractogel-EMD-Chelate, EMD, que possui grupos funcionais aos quais metais de transição podem se ligar.

Em sua preparação para uso, a resina é carregada com íons de cobre II através de uma solução de sulfato de cobre. Proteínas capazes de interagir com os íons de cobre imobilizados são retidas na coluna e os contaminantes que não se ligam são retirados do sistema.

A resina carregada Fractogel-EMD-Chelate-Cu(II) é usada no processo de purificação para remover do sistema contaminantes que não se ligam ao metal imobilizado ou que necessitam de maiores concentrações de imidazol para eluição do que o fator IX ativo.

Nessa cromatografia, são realizadas as mesmas etapas de CTA-20001, além das etapas de lavagem para carga, carga e lavagem em duas etapas para remover íons não ligados à resina e ajuste de pH.

Na lavagem que antecede a alimentação da coluna, é realizada uma etapa para garantir que toda a alimentação passou através da coluna.

Para dimensionar o volume de resina necessário a essa etapa de cromatografia considera-se que a massa de fator IX recombinante ativo que é alimentada na coluna é de 65,75 g e que a capacidade de adsorção de fator IX ativo na resina é de 0,5 g/ L de resina ^[61]. Dessa maneira, o

volume operacional de resina é de 131,5 L e, considerando uma margem de segurança de 80% para garantir máxima ligação do fator com a resina, o volume de resina de projeto é de 164,4 L.

Com o volume de resina de projeto é possível dimensionar o diâmetro, altura do leito e altura da coluna pela fichas técnicas de colunas cromatográficas disponíveis no mercado. Para o dimensionamento de CAM-10001 não foi possível utilizar a família de colunas BPG, da GE HealthCare como nas demais colunas, pois o volume de resina de projeto é muito elevado. Foi então escolhida uma coluna AxiChrom, ilustrada na Figura 37.



Figura 37. Coluna AxiChrom, da GE HealthCare [Catálogo do Fabricante].

Pelo volume de resina de projeto é possível selecionar, no catálogo do fabricante, o modelo da coluna que tem tal capacidade. Dessa maneira, tem-se o diâmetro e a altura da coluna, que são especificados em cada modelo. Com o diâmetro da coluna e o volume de resina, calcula-se a altura do leito. Com esse valor, é possível confirmar se a coluna escolhida é realmente a desejada, pois cada modelo possui altura mínima e máxima do leito.

Para um volume de resina de projeto de 164,4 L, foi selecionada a coluna AxiChrom 1000/300, que tem 100 cm de diâmetro e 50 cm de altura. A altura do leito calculada foi de 20,9 cm, que está dentro da faixa admitida pela coluna.

Para a coluna AxiChrom 1000/300 também é utilizado o sistema cromatográfico AKTAprocess, do mesmo fabricante, mas em dimensões maiores que o sistema das demais colunas.

É importante ressaltar que a resina deve ser substituída a cada 150 ciclos de cromatografia [15].

No catálogo da resina Fractogel-EMD-Chelate, é fornecida uma faixa de velocidade na qual as corridas deveriam ocorrer. Foi escolhida como velocidade 400 cm/h, que quando multiplicada pela área da seção reta da coluna ($\pi D^2/4$), fornece o valor da vazão volumétrica da coluna, que é de 3141,6 L/h. Também no catálogo da resina é explicitado que a velocidade para procedimentos de limpeza – CIP e sanitização – a velocidade deveria ser de 40 cm/h.

A Tabela 30, esquematizada segundo Silveira et al. [15], mostra, para cada etapa da cromatografia, a composição da solução tampão e quantos volumes desta necessitam ser utilizados na coluna.

Tabela 30 – Volume do Leito e Composição da Solução Tampão de cada Etapa de CAM-20001.

Etapa do Processo		Volumes do Leito	Tampão Utilizado
Lavagem para carga [47]		2	100 mM ácido acético, 500 mM NaCl, pH = 4,0
Carga [47]		1	200 mM CuSO ₄ , 500 mM NaCl, pH = 4,0
Lavagem para remover íons não ligados à resina e ajuste de pH [47]	1 ^a Etapa	2	100 mM ácido acético, 500 mM NaCl, pH = 4,0
	2 ^a Etapa	2	200 mM imidazol, 500 mM NaCl, pH = 7,1
Equilíbrio [47]		4	200 mM K ₂ HPO ₄ , 200 mM NaCl, pH = 7,1
Lavagem [47]		5	200 mM K ₂ HPO ₄ , 200 mM NaCl, pH = 7,1
Eluição [47]		5	20 mM K ₂ HPO ₄ , 15 mM imidazol, 100 mM NaCl, pH = 7,1
Regeneração (*)		2	1 M NaCl
CIP		2	1 M NaOH, 20% isopropanol, 20% etanol, 2% lauril sarcosinato de sódio
Sanitização (*)	1 ^a Etapa	1	1 M NaOH
	2 ^a Etapa	1	1% Polisorbato 80/0,01M HCl

(*)Catálogo do Fabricante da Resina.

Com o número de volumes do leito e o volume de projeto da coluna, é possível saber o volume de solução tampão de cada etapa e, com este valor dividido pela vazão da etapa, é possível calcular o tempo de cada uma. Na Tabela 31 estão presentes os valores do volume e tempo de cada etapa. Também é calculada a soma dos tempos de aplicação da amostra, lavagem e eluição, pois esta soma é o tempo gasto durante o processo de purificação do fator IX, uma vez que as demais etapas podem ser realizadas ao mesmo tempo de outros processos. A Tabela 31 também o

tempo total de um ciclo de cromatografia com CIP e o tempo das demais etapas, considerado tempo para manutenção da coluna.

Tabela 31 – Volume e Tempo de cada Etapa de CAM-20001.

Etapa do Processo		Volume (L)	Tempo (h)
Aplicação da Amostra		76,1	0,02
Lavagem para carga		328,8	0,10
Carga		164,4	0,05
Lavagem para remover íons não ligados à resina e ajuste de pH	1ª Etapa	328,8	0,10
	2ª Etapa	328,8	0,10
Equilíbrio		657,5	0,21
Lavagem		821,9	0,26
Eluição		821,9	0,26
Regeneração		328,8	0,10
CIP		328,8	1,05
Sanitização	1ª Etapa	164,4	0,52
	2ª Etapa	164,4	0,52
Tempo aplicação + lavagem + eluição			0,55
Tempo Total de 1 Ciclo com CIP			3,32
Tempo para manutenção			2,77

Em CAM-20001, como o rendimento é de 95%, a massa de fator IX ativo presente no eluído é de 62,46 g. O eluído será alimentado em TQE-20006, que alimentará UFL-20002.

5.17.1 Folha de Especificações de CAM-20001

A Folha de Especificações 17 mostra as principais características de CAM-20001.

Folha de Especificações 17 – CAM-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	CAM-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Coluna de Afinidade com Metal Imobilizado
Serviço	4ª Etapa Cromatográfica para Purificação do Fator IX
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-009	PP-20-010
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	AxiChrom 1000/300
Fabricante	GE HealthCare
Material	Vidro
Resina	Fractogel-EMD-Chelate
Sistema Cromatográfico	AKTAprocess
Volume de Resina (L)	164,4
Diâmetro (cm)	100
Altura (cm)	50
Altura do Leito (cm)	20,9
Dimensão na Planta – L x C x H (cm)	130 x 172 x 190,5
Peso (kg)	2560
Vazão de Operação (L/h)	3141,6
Tempo de Aplicação da Amostra, Lavagem e Eluição (h)	0,55
Tempo Total de um Ciclo, com CIP (h)	2,77

5.18 TQE-20006: Tanque de Equalização

O tanque de equalização TQE-20006, sem agitação, foi projetado para armazenar todo o volume de efluído proveniente de CAM-20001.

Sendo assim, seu volume operacional é de 822 L e, utilizando uma porcentagem máxima do tanque de 90% por este não ter agitação, o volume de projeto de TQE-20005 será de 920 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

5.18.1 Folha de Especificações de TQE-20006

A Folha de Especificações 18 mostra as principais características de TQE-20006.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQE-20006
Nº de Ordem	006
Descrição	Tanque de Equalização
Serviço	Coleta do Volume de Eluído de CAM-20001 para Alimentação de UFL-20002
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-012	PP-20-013
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Alimentação (L/h)	3141,6
Vazão de Descarga (L/h)	547,9
Volume (L)	920

5.19 UFL-20002: Sistema de Ultrafiltração

O sistema de ultrafiltração foi projetado para concentrar em quinze vezes o volume (*15-fold*) do meio de cultivo contendo fator IX utilizando membranas com tamanho de corte de 10 kDa assim como em UFL-20001. Como o fator IX recombinante tem peso molecular de 55 kDa, este ficará retido na membrana.

Para dimensionamento do sistema de ultrafiltração, serão utilizados os dados presentes na Tabela 32.

Tabela 32 – Dada para o Dimensionamento de UFL-20002.

Parâmetro	Valor
Volume de Alimentação (L)	821,9
Tempo (h) (*)	1,5
Fluxo de Permeado (L/ h m ²) [58]	51
Delta P na membrana (bar) [58]	1
Volume de Concentrado em Relação à Alimentação (%) (**)	15

(*) Dado de Projeto

(**) Dado de Projeto dimensionado para o envasamento da solução de fator IX nos frascos contendo 250, 500, 1000 e 2000 UI

O tempo foi dimensionado pelo mesmo critério utilizado no dimensionamento de MFL-20001.

Com os valores do tempo e volume de concentrado em relação à alimentação, é possível calcular as vazões de alimentações, de concentrado e de permeado, e os volumes de concentrado e permeado. As equações para esse cálculo se encontram no Anexo 9.3.

Com os valores do fluxo de permeado à pressão de transmembrana e tempo é possível calcular a área da membrana necessária à ultrafiltração pela equação (4), descrita no tópico 5.6.

Os parâmetros de dimensionamento do sistema de ultrafiltração UFL-20002 calculados estão descritos na Tabela 33.

Tabela 33 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20002.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	547,9
Vazão de Concentrado (L/h)	36,5
Vazão de Permeado (L/h)	511,34
Volume de Concentrado (L)	54,8
Volume de Permeado (L)	767,1
Área da Membrana (m ²)	10,0

O sistema é composto por um módulo de membranas de ultrafiltração de 10,0 m² que deve ser substituído duas vezes ao ano, segundo recomendação do fabricante.

A limpeza das membranas é realizada após cada operação com solução 0,1M de NaOH por 1 hora ^[57].

Como o rendimento da ultrafiltração é de 95 %, a massa de fator IX recombinante ativo presente no permeado de UFL-20002 é de 59,34 g.

5.19.1 Folha de Especificações de UFL-20002

A Folha de Especificações 19 mostra as principais características de UFL-20002.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	UFL-20002
Nº de Ordem	002
Descrição	Sistema de Ultrafiltração
Serviço	Concentração do Fator IX para Inativação Viral em TQI-20001
P&ID	DE-20-002
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-013	PP-20-014
	RJ-20-107
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Fabricante	PamMembranas
Material	Aço INOX 316
Tempo de Operação (h)	1,5
Pressão de Operação (bar)	1
Fluxo de Permeado (L/h m ²)	51
Área da Membrana (m ²)	10,0
Vazão de Alimentação (L/h)	547,9
Vazão de Concentrado (L/h)	36,5
Vazão de Permeado (L/h)	511,31
Tamanho de Corte (kDa)	10

5.20 TQI-20001: Tanque de Inativação Viral

Para inativação viral do fator IX, diferentemente da purificação por nanofiltração, que pelo tamanho de corte da membrana Virossolve de 70 kDa, descrita por Walsh no processo de produção do fator IX recombinante BeneFIX ^[49].

Essa escolha foi feita, porque realizar uma ultrafiltração com tamanho de corte de 70 kDa que é muito próximo do peso molecular do fator IX recombinante, o que acarretaria em uma perda considerável de massa do fator, uma vez que o diâmetro dos poros da membrana sofrem variação.

Além disso, há relatos na literatura ^[46] de que o método do solvente e detergente (SD) é bastante eficaz na inativação viral de fator IX ao romper a parede lipídica de vírus em estado latente.

Foram utilizados TNBP, solvente, e Triton X-100, detergente, com concentrações de 0,3% e 1% em volume ^[62], respectivamente.

A alimentação contendo fator IX recombinante ativo é proveniente do concentrado de UFL-20002, sendo o volume de alimentação dessa solução de 54,8 L.

Dessa maneira, os volumes de TNBP e Triton X-100 são, respectivamente, 170 mL e 0,56 L, o que faz com que o volume operacional de TQI-20001 seja de 55,5 L. Utilizando uma porcentagem do tanque em torno de 80% por este ter agitação para promover o contato de possíveis vírus com o solvente e o detergente, o volume de projeto de TQI-20001 será de 70 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

Para que a inativação viral seja efetiva, o tempo de residência da solução no tanque é de 3 horas.

Por possuir um rendimento de 85%, a solução de TQI-20001 que alimentará UFL-20003 terá 50,44 g de fator IX recombinante ativo.

5.20.1 Folha de Especificações de TQI-20001

A Folha de Especificações 20 mostra as principais características de TQI-20001.

Folha de Especificações 20 – TQI-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQI-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Tanque de Inativação Viral
Serviço	Inativação Viral do Fator IX
P&ID	DE-20-003
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-014	PP-20-015
DT-20-108	
SV-20-109	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Vazão de Alimentação (L/h)	36,5
Vazão de Descarga (L/h)	55,5 / 59,5 / 69,4 / 104,1
Volume (L)	70
Tempo de Operação (h)	3

5.21 TQD-20002: Tanque de Dialisante

Após a inativação viral será realizada mais uma etapa de ultra/diafiltração. A ultrafiltração tem como objetivo concentrar a solução de fator IX recombinante ativo advinda de TQI-20001

enquanto que quando operar sob o modo de diafiltração tem como finalidade trocar o tampão, a fim de realizar sua formulação para envase e liofilização.

A concentração na ultrafiltração será feita levando em consideração a massa de fator IX ativo presente após a inativação viral, que é convertida em UI através da atividade por massa de fator IX total e tendo a porcentagem de fator IX ativo em relação ao fator IX total, dados presentes na Tabela 8.

Como na planta serão produzidos fármacos com 250, 500, 1000 e 2000 UI em frascos de 10 mL, o volume necessário a esses fármacos foi dimensionado de modo que o volume de solução formulado em cada frasco não ultrapassasse 8 mL por segurança no momento do envase e da liofilização.

Na ultrafiltração, a solução a ser formulada corresponde ao concentrado de UFL-20003 como será explicado a seguir e, como a solução para formulação do fármaco de 2000 UI deve ser duas vezes mais concentrada do que a solução do fármaco de 100 UI, que deve ser duas vezes mais concentrada que a do fármaco de 500 UI e assim por diante, o sistema de ultrafiltração será dimensionado para ter a área necessária à concentração do fármaco de 2000 UI e o tanque de dialisante, para comportar o volume de concentrado necessário à formulação do fármaco de 250 UI.

A solução dialisante será água de alta pureza para injeção (WFI – *Water for Injection*), que é o tampão utilizado na formulação e a diafiltração estará completa quando 5 volumes de concentrado passarem através da membrana, indo para o tanque de formulação uma solução de fator IX recombinante ativo em WFI.

Como será visto no dimensionamento de UFL-20003, o volume de concentrado para formulação do fármaco de 250 UI será de 27,8 L, que será utilizado para o dimensionamento de TQD-20002 por ser maior que os demais volumes de concentrado.

Dessa maneira, o volume de solução dialisante necessária para troca de tampão do concentrado para produção do fármaco de 250 UI é de 138,8 L. Utilizando uma porcentagem do tanque máxima de 90 % por este não ter agitação, o volume de projeto de TQD-20002 será de 160 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

A diafiltração será operada a volume constante de concentrado, sendo a vazão de solução dialisante misturada ao concentrado a mesma vazão do permeado que deixa UFL-20003, que é de 52,0 L/h para os fármacos de todas as UI. O que muda para dar duas concentrações é o tempo de operação do tanque, que é de 2,67 h para 250 UI, 1,33 h para 500 UI, 0,67 h para 1000 UI e 0,33 h para 2000 UI. Como estes tempos não são utilizados para o dimensionamento do sistema de

ultrafiltração, estão sendo contabilizados no tempo global de operação da planta como tempo de operação do tanque de dialisante.

5.21.1 Folha de Especificações de TQD-20002

A Folha de Especificações 21 mostra as principais características de TQD-20002.

Folha de Especificações 21 – TQD-20002.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	TQD-20002
Nº de Ordem	002
Descrição	Tanque de Dialisante
Serviço	Troca de Tampão do Fator IX para Formulação em TQI-20001
P&ID	DE-20-003
CORRENTES	
Entrada	Saída
ST-20-109	ST-20-110
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Material	Aço INOX 316
Vazão de Descarga (L/h)	52,0
Volume (L)	160
Tempo de operação (h)	2,67 / 1,33 / 0,67 / 0,33

5.22 UFL-20003: Sistema de Ultrafiltração

O sistema de ultrafiltração foi projetado para concentrar em dezesseis vezes o volume (*16-fold*) de solução contendo fator IX ativo advinda de TQI-20001 para a produção de 2000 UI por frasco, em 8 vezes (*8-fold*) para a produção de 1000 UI, em 4 vezes (*4-fold*) para a produção de 500 UI e em 2 vezes (*2-fold*) para a produção de 250 UI, de modo que, o volume de solução formulada não ultrapassasse 8 mL por frasco. A ultrafiltração foi realizada utilizando membranas com tamanho de corte de 10 kDa assim como em UFL-20001. Como o fator IX recombinante tem peso molecular de 55 kDa, este ficará retido na membrana. O dimensionamento da área de filtração foi calculado em função da concentração desejada para o fármaco de 2000 UI, por esta fornecer o maior valor de área.

Para dimensionamento do sistema de ultrafiltração, serão utilizados os dados presentes na Tabela 34.

Tabela 34 – Dados para o Dimensionamento de UFL-20003.

Parâmetro	Valor
Volume de Alimentação (L)	52,5
Tempo (h) (*)	1
Fluxo de Permeado (L/ h m ²) [58]	51
Delta P na membrana (bar) [58]	1
Volume de Concentrado em Relação à Alimentação (%) (**)	16

(*) Dado de Projeto

(**) Dado de Projeto dimensionado para o envasamento da solução de fator IX nos frascos contendo 250, 500, 1000 e 2000 UI

O tempo foi dimensionado pelo mesmo critério utilizado no dimensionamento de MFL-20001.

Com os valores do tempo e volume de concentrado em relação à alimentação, é possível calcular as vazões de alimentações, de concentrado e de permeado, e os volumes de concentrado e permeado. As equações para esse cálculo se encontram no Anexo 9.3.

Com os valores do fluxo de permeado à pressão de transmembrana e tempo é possível calcular a área da membrana necessária à ultrafiltração pela equação (4), descrita no tópico 5.6.

Os parâmetros de dimensionamento do sistema de ultrafiltração UFL-20003, com base no fármaco de 2000 UI, calculados estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20003, com base no fármaco de 2000 UI.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	55,5
Vazão de Concentrado (L/h)	3,5
Vazão de Permeado (L/h)	52,0
Volume de Concentrado (L)	3,5
Volume de Permeado (L)	52,0
Área da Membrana (m ²)	1,0

No dimensionamento dos demais fármacos, foi utilizada a mesma área de membrana, variando o tempo de operação.

Os parâmetros de dimensionamento do sistema de ultrafiltração UFL-20001, com base nos fármacos de 1000, 500 e 250 UI calculados estão descritos nas Tabelas 36 a 38, respectivamente.

Tabela 36 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20003, com base no fármaco de 1000 UI.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	59,5
Vazão de Concentrado (L/h)	3,5
Vazão de Permeado (L/h)	52,0
Volume de Concentrado (L)	3,5
Volume de Permeado (L)	52,0
Tempo de filtração (h)	0,93

Tabela 37 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20003, com base no fármaco de 500 UI.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	69,4
Vazão de Concentrado (L/h)	17,3
Vazão de Permeado (L/h)	52,0
Volume de Concentrado (L)	13,9
Volume de Permeado (L)	41,6
Tempo de filtração (h)	0,8

Tabela 38 – Parâmetros de Dimensionamento de UFL-20003, com base no fármaco de 250 UI.

Parâmetro	Valor
Vazão de Alimentação (L/h)	104,1
Vazão de Concentrado (L/h)	52,1
Vazão de Permeado (L/h)	52,0
Volume de Concentrado (L)	27,8
Volume de Permeado (L)	27,8
Tempo de filtração (h)	0,53

O sistema é composto por um módulo de membranas de ultrafiltração de 1,0 m² que deve ser substituído duas vezes ao ano, segundo recomendação do fabricante.

A limpeza das membranas é realizada após cada operação com solução 0,1M de NaOH por 1 hora ^[57].

Como o rendimento da ultrafiltração é de 95 %, a massa de fator IX recombinante ativo presente no permeado de UFL-20003 é de 47,92 g.

5.22.1 Folha de Especificações de UFL-20003

A Folha de Especificações 22 mostra as principais características de UFL-20003.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÕES	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 – Purificação
TAG	UFL-20003
Nº de Ordem	003
Descrição	Módulo de Ultrafiltração
Serviço	Concentração do Fator IX para Formulação em TQF-20001
P&ID	DE-20-003
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-015	PP-20-016
	RJ-20-112
	PP-20-017
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Fabricante	PamMembranas
Material	Aço INOX 316
Tempo de Operação (h)	0,53 / 0,8 / 0,93 / 1
Pressão de Operação (bar)	1
Fluxo de Permeado (L/h m ²)	51
Área da Membrana (m ²)	1,0
Vazão de Alimentação (L/h)	55,5 / 59,5 / 69,4 / 104,1
Vazão de Concentrado (L/h)	3,5 / 7,4 / 17,3 / 52,1
Vazão de Permeado (L/h)	52,0
Tamanho de Corte (kDa)	10

5.23 TQF-20001: Tanque de Formulação

Assim como TQD-20002, o tanque de formulação foi projetado para comportar o volume de concentrado advindo de UFL-20003 quando operando para a produção do fármaco de 250 UI por frasco, mais o volume dos estabilizantes necessários para sua formulação. A Tabela 39 mostra os estabilizantes, sua concentração e finalidade.

Tabela 39 – Estabilizantes Necessários à Formulação do Fator IX Recombinante, Concentração e Finalidade ^[49].

Componente	Composição	Finalidade
Histidina	10 mM	Possibilita estabilidade tamponante no pH desejado e minimiza formação de agregados no estado liofilizado
Glicina	260 mM	Possibilita alta qualidade da morfologia do pó
Sacarose	1 %	Proteção no estado congelado e seco
Polisorbato-80	0,005 %	Proteção contra danos de congelamento

Como não foi mencionada a relação da porcentagem, esta foi considerada como sendo massa por volume.

A Tabela 40 mostra o volume de solução contendo fator IX que entra em TQF-20001, a quantidade dos estabilizantes de formulação e o volume operacional do tanque para os fármacos de 2000, 1000, 500 e 250 UI. Nesses cálculos é levado em consideração o rendimento de 90% da etapa posterior de liofilização.

Tabela 40 – Parâmetros de Formulação.

UI	250	500	1000	2000
Volume de Solução de Fator IX (L)	27,8	13,9	6,9	3,5
Massa de Histidina (g)	53,6	26,8	13,4	6,7
Massa de Glicina (g)	674,17	377,08	168,54	84,27
Massa de Sacarose(g)	55	27,5	13,7	6,9
Volume de Polissorbato-80 (mL)	171	86,6	43	21,7
Volume Operacional de TQF-20001 (L)	34,4	17,2	8,6	4,3

Sendo o maior volume operacional do tanque 34,4 L, correspondente à formulação do fármaco de 250 UI como mencionado anteriormente, e, utilizando uma porcentagem do tanque em torno de 80 % por este ter agitação para promover a mistura, o volume de projeto de TQF-20001 será de 50 L. Esse volume de projeto é calculado pela equação (6), descrita no tópico 5.5.

Para uma formulação de qualidade, o tempo de residência do tanque será de 1 h.

Com o volume operacional correspondente a cada UI, como cada frasco tem 10 mL, foi possível dimensionar a quantidade de frascos contendo a UI correspondente produzida em um dia que a planta opere para produzir o fármaco com determinada UI, já considerando o rendimento da etapa posterior de liofilização, que é de 90%.

Para cada frasco, também será provida uma seringa de 10 mL contendo 5 mL de solução aquosa 0,234 %m/v^[63] de NaCl.

Para cada formulação, a quantidade de frascos e seringas utilizados na produção de um dia está na Tabela 41.

Tabela 41 – Quantidade de Frascos e Seringas Utilizados na Produção de 1 Dia.

UI	250	500	1000	2000
Quantidade de Frascos	4140	2070	1035	517,5
Quantidade de Seringas	4140	2070	1035	517,5

Como a quantidade de frascos para a formulação de 2000 UI é quebrada, está terá que ser produzida em dois dias seguidos, para que o volume restante de um dia seja congelado de 2 a 8 °C^[47] para ser utilizado no dia seguinte, evitando a perda de produto.

O frasco é de vidro transparente do Tipo 1, o mais indicado para um fármaco injetável, e a seringa é descartável e sem agulha, pois seu conteúdo não será injetado diretamente no paciente, será misturado no frasco contendo fator IX recombinante em forma de pó. O frasco e a seringa utilizados estão representados nas Figuras 38 e 39.

O frasco escolhido tem 20 mm de diâmetro interno e 22 mm de diâmetro externo, com altura de 50 mm.



Figura 38. Frasco de 10 mL de Vidro do Tipo 1 ^[64].



Figura 39. Seringa de 10 mL Descartável e sem Agulha ^[65].

5.23.1 Folha de Especificações de TQF-20001

A Folha de Especificações 23 mostra as principais características de TQF-20001.

Folha de Especificações 23 – TQF-20001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÃO	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	20 - Purificação
TAG	TQF-20001
Nº de Ordem	001
Descrição	Tanque de Formulação
Serviço	Formulação do Fator IX
P&ID	DE-20-003
CORRENTES	
Entrada	Saída
PP-20-017	PF-20-018
EF-20-112	
EF-20-113	
EF-20-114	
EF-20-115	
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	
Fabricante	
Material	Aço INOX 316
Sistema de Agitação	
Vazão de Alimentação (L/h)	3,5 / 7,4 / 17,3 / 52,1
Volume (L)	50
Tempo de Operação (h)	1

5.24 ENV-30001: Envasadora

A etapa de envase da solução formulada, concentrado de fator IX purificado e esterilizado, tem como objetivo encher os frascos com essa solução para posterior liofilização, e fechá-los. O módulo de fechamento de frascos estará acoplado ao liofilizador.

Para o envase será utilizada a envasadora modelo FFV 6024, da Bausch+Ströebel, que está ilustrado na Figura 40. Ela foi escolhida por ter capacidade de encher até 18000 frascos por hora

[15]



Figura 40. Envasadora de frascos modelo FFV 6024, da Bausch+Ströebel [66].

5.24.1 Folha de Especificações de ENV-30001

A Folha de Especificações 24 mostra as principais características de ENV-30001.

Folha de Especificações 24 – ENV-30001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÃO	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	30 – Envase e Liofilização
TAG	ENV-30001
Nº de Ordem	001
Descrição	Envasadora
Serviço	Envase do Fator IX
P&ID	DE-30-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PF-20-018	PE-30-001
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	FFV 6024
Fabricante	Bausch+Ströebel
Material	Aço Inox 316
Caacidade (frascos/h)	18000
Estação de fechamento apropriada para produtos liofilizados	

5.25 LIO-30001: Liofilizador

A liofilização ou secagem a frio (*freeze dry*) é o mais nobre processo de conservação de produtos biológicos conhecido, pois envolve os dois métodos mais confiáveis de conservação: o congelamento e a desidratação.

Sem conservantes ou produtos químicos, é o processo mais adequado para preservar células, enzimas, vacinas, fármacos e microorganismos.

Para ser liofilizado, o produto deve estar congelado a uma temperatura bem baixa, geralmente abaixo de -30°C , e depois ser submetido a uma pressão negativa (vácuo), fazendo com que a água dos produtos seja retirada por sublimação. O resultado final é um produto com estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água.

Dessa maneira, a liofilização tem como objetivo fornecer o produto na forma de pó liofilizado para que quando conservados adequadamente, mesmo à temperatura ambiente, resistam intactos por anos. A legislação brasileira permite pelo menos dois anos de validade.

O rendimento da liofilização é de 90%.

O liofilizador escolhido é o modelo Lyogamma LG 30-5, da Telstar, por ter capacidade de 4212 frascos de 22 mm de diâmetro. A Figura 41 ilustra o liofilizador.



Figura 41. Liofilizador modelo Lyogamma LG 30-5, da Telstar ^[Catálogo do Fabricante].

5.25.1 Folha de Especificações de LIO-30001

A Folha de Especificações 25 mostra as principais características de LIO-30001.

Folha de Especificações 25 – LIO-30001.

FOLHA DE ESPECIFICAÇÃO	
IDENTIFICAÇÃO	
Área	30 – Envase e Liofilização
TAG	LIO-30001
Nº de Ordem	001
Descrição	Liofilizador
Serviço	Liofilização do Fator IX
P&ID	DE-30-001
CORRENTES	
Entrada	Saída
PE-30-001	PL-30-002
DADOS DE DIMENSIONAMENTO	
Modelo	Lyogamma LG 30-5
Fabricante	Telstar
Material	Aço Inox 316
Nº de Placas Úteis	5
Interdistância entre as Placas (mm)	100
Dimensão das Placas – L x C (mm)	450 x 800
Superfície Útil das Placas (m ²)	1,8
Capacidade do Condensador (kg)	30
Faixa de Temperatura das Placas (°C)	-60 a + 80
Temperatura Final do Condensador (°C)	< - 75
Dimensão na Planta – L x C (mm)	1263 x 3250
Peso Aproximado (kg)	2500
Capacidade para frascos de 22 mm de diâmetro	4212

5.26 Dimensionamento da Área Útil da Planta

Após o dimensionamento de todos os equipamentos presentes em cada área útil da planta é possível projetar a área útil de cada área da planta.

Além da área ocupada pelos equipamentos principais, foi levado em consideração o espaço necessário para tubulação, equipamentos secundários, dispositivos de controle e segurança, estoque de matérias-primas, acessos para locomoção segura de funcionários e componentes móveis da planta. Dessa maneira, foi obtida a dimensão das três áreas úteis da planta, como mostra a Tabela 42.

Tabela 42 – Dimensionamento da Área Útil da Planta.

Identificação	Descrição	Classificação (FED STD / ISO)	Área Útil (m²)
10	Cultivo Celular para Síntese de Fator IX Recombinante	10000 / ISO7	40
20	Purificação de Fator IX Recombinante	1000 / ISO6	80
30	Envase e Liofilização de Fator IX Recombinante	100 / ISO5	30

5.27 Cálculo do Tempo de Purificação do Fator IX Recombinante

A Tabela 43 mostra o tempo total de purificação e formulação gasto nas diferentes dosagens do fármaco produzido.

Tabela 43– Tempo de Purificação e Formulação para dosagens de 250, 500, 1000 e 2000 UI.

Etapa/ Dosagem	Tempo (h)			
	250 UI	500 UI	1000 UI	2000 UI
Microfiltração	2	2	2	2
Ultrafiltração	2	2	2	2
Diafiltração	0,53	0,53	0,53	0,53
1ª Cromatografia	0,75	0,75	0,75	0,75
2ª Cromatografia	2,78	2,78	2,78	2,78
3ª Cromatografia	3,11	3,11	3,11	3,11
4ª Cromatografia	0,55	0,55	0,55	0,55
Ultrafiltração	1,5	1,5	1,5	1,5
Inativação Viral	3	3	3	3
Diafiltração	3,67	1,33	0,67	0,33
Ultrafiltração	0,53	0,8	0,93	1
Formulação	1	1	1	1
TEMPO TOTAL (h)	21,42	19,35	18,82	18,55

Pela análise da Tabela 43, o fármaco com dosagem de 250 UI é o que leva mais tempo a ser purificado e formulado, devido à segunda etapa de diafiltração, por ser menos concentrado. Nenhum dos tempos ultrapassou 24 h, o que significa que é possível a realização de uma batelada de purificação e formulação por dia.

Quanto ao cultivo celular para síntese do fator IX recombinante, este é realizado continuamente e o volume da produção diária é recolhido para ser purificado, formulado, envasado e liofilizado em bateladas diárias.

O tempo das etapas de envase e liofilização não foi contabilizado, por elas serem realizadas em outra área, sendo seu independente do tempo de purificação e formulação.

O capítulo 6 tem como objetivo avaliar a viabilidade econômica do projeto, primeiramente estimando o investimento total e o custo total de produção do projeto em questão e a, partir destes dados realizar, análises que informem se o projeto é ou não é viável economicamente.

6.1 Introdução

A função básica de qualquer empresa que deseja continuar nos negócios é obter lucro. Na indústria de biofármacos isto não é diferente, empresas foram fundadas ao longo dos anos e continuam a existir graças aos lucros oriundos da produção e venda de seus produtos. Para tanto, são necessárias pesquisa de mercado e avaliações econômicas em cima do processo estudado e desenvolvido para se chegar a uma conclusão se é válida ou não a produção de um determinado produto ¹⁵⁷.

O produto em questão, Fator IX, foi escolhido para este trabalho por ter sido identificada necessidade do mercado nacional por tal biofármaco e por este ter a chance de ser produzido em território nacional, trazendo benefícios para a economia nacional. Além disto, como o produto em questão é comprado pelo Ministério da Saúde para ser repassado aos portadores de Hemofilia tipo B e o governo possui a obrigação de prover tal medicamento a todos, isto significa que a produção será consumida até que se atenda totalmente a demanda nacional, o que irá garantir receita durante a produção, favorecendo a obtenção de lucros por parte do projeto.

6.2 Estimativa de Custos

Na análise de custos serão levados em consideração o investimento total e o custo total de produção (CTP).

Os preços dos equipamentos e das matérias-primas envolvidas no cálculo da estimativa de custos da produção do Fator IX foram obtidos junto a fornecedores.

Certos equipamentos, como os Biorreatores e os Tanques de Equalização, tiveram seus preços obtidos através de uma curva de preço em função da capacidade do equipamento, pois os fornecedores não possuíam o preço para o equipamento com a capacidade que será utilizada neste trabalho. Como as curvas obtidas tiveram um bom ajuste, os preços calculados podem ser considerados confiáveis.

Alguns preços disponíveis de matérias-primas não eram atuais, então foram atualizados utilizando-se o índice de inflação IGP-DI anual, obtido no site da Fundação Getúlio Vargas. O Índice Geral de Preços - Disponibilidade Interna (IGP-DI), da FGV, reflete as variações de preços de todo o mês de referência, ou seja, do primeiro ao trigésimo dia de cada mês. Ele é formado pelo IPA (Índice de Preços por Atacado), IPC (Índice de Preços ao Consumidor) e INCC (Índice Nacional do Custo da Construção), com pesos de 60%, 30% e 10%, respectivamente. O indicador apura as variações de preços de matérias-primas agrícolas e industriais no atacado e de bens e serviços finais no consumo ^[53]. Como o trabalho se trata de um projeto de uma indústria, este índice foi decidido como adequado para a correção dos preços das matérias-primas.

Também ocorreu de diversas vezes o preço obtido estar em moeda diferente do Real (Dólar, Franco Suíço e Euro). Portanto, para se fazer a conversão para Real foi utilizada a taxa de câmbio do dia 11 de setembro informada pelas agências Reuters, CMA e Infosel financiero, com os valores descritos na Tabela 44.

Tabela 44 – Taxas de Câmbio ^[10].

Real – Dólar Comercial	1,827
Real – Franco Suíço	1,7584
Real - Euro	2,6627

6.2.1 Investimento Total

Investimento pode ser definido como qualquer aplicação de recursos de capital com vista à obtenção de um fluxo de benefícios, ao longo de um determinado período futuro. A estimativa do investimento total faz-se necessária em estudos de viabilidade econômica de projetos industriais, pois, em muitos casos, pode ser decisivo na decisão de implantação.

O montante de recursos necessários para a execução do projeto é o Investimento Total, que é constituído de três parcelas: investimento fixo, capital de giro e custos de partida da planta ^[70].

Investimento fixo é a parte do investimento destinada à aquisição e instalação de equipamentos, incluindo todos os recursos auxiliares necessários para a implantação do processo. O método escolhido para se estimar o valor do investimento fixo é o que se baseia no valor dos principais equipamentos que serão utilizados no projeto, por eles representarem a maior parte do investimento na indústria química. Tal método pode ser utilizado visto que se dispõe de informações sobre todos os equipamentos que, de acordo com o trabalho, serão empregados no

caso de implantação do projeto. A margem de erro dessa estimativa do investimento fixo é de aproximadamente 10% [69].

Feita a estimativa, o investimento fixo pode ser dividido em duas partes: investimentos diretos e indiretos.

Os investimentos diretos podem ser divididos nos custos ISBL (*inside battery limits*), relacionados aos custos das unidades envolvidas no processo, por exemplo, os equipamentos, máquinas e materiais, e os custos OSBL (*outside battery limits*), relacionados às unidades auxiliares necessárias ao processo, tais como unidades de tratamento de efluentes e instalações complementares, dentre outros.

Neste trabalho, os custos ISBL são considerados compostos pela aquisição e instalação dos equipamentos, controle e instrumentação, tubulações e materiais e equipamentos elétricos. Como cada um destes componentes equivale a uma porcentagem do custo de aquisição dos equipamentos principais conforme descrito na Tabela 45, tendo o valor dos equipamentos calcula-se o valor dos custos ISBL. Os custos OSBL equivalem a um valor igual a 45% dos custos ISBL [71]. Na tabela 45, os custos ISBL e OSBL são detalhados por componentes.

Tabela 45 – Composição dos Custos ISBL (*inside battery limits*) e OSBL (*outside battery limits*) [71].

Item		% CIF*	% custo de aquisição dos equipamentos principais
ISBL	Aquisição de equipamentos	20 – 40	100
	Instalação dos equipamentos	7,3 – 26	35 – 45
	Controle e instrumentação	2,5 – 7,0	6 – 30
	Tubulações	3 – 15	10 – 80
	Materiais e equipamentos elétricos	2,5 – 9,0	8 – 20
OSBL	Construção (incluindo serviços)	6 – 20	-
	Obras preliminares	1,5 – 5,0	-
	Utilidades	8,0 – 35,0	-
	Terreno	1 – 2	-

*CIF: Custos de Investimento Fixo.

Como o projeto desenvolvido é para a produção de um biofármaco, há um custo adicional referente à construção de áreas limpas por uma questão de segurança e higiene do processo. A classificação de cada área é descrita na norma NBR 13700 [68] e cada uma delas possui um custo obtido junto a fornecedores conforme a Tabela 46.

Tabela 46 – Classificação Conforme Norma NBR 13700 e Custo de Construção ^{[68]. [67].}

Identificação	Descrição	Classificação (FED STD / ISO)	Custo (R\$/m²)
10	Cultivo Celular para Síntese de Fator IX Recombinante	10000 / ISO7	4443,00
20	Purificação de Fator IX Recombinante	1000 / ISO6	7331,00
30	Envase e Liofilização de Fator IX Recombinante	100 / ISO5	13329,00

No presente projeto se estimou a área da planta relativa a cada uma das classes citadas anteriormente. O custo desta construção foi adicionado aos investimentos diretos.

Investimentos indiretos são os gastos que não estão diretamente envolvidos com o material e a mão-de-obra das instalações do projeto, por exemplo, custos com engenharia e supervisão, construção, patentes entre outros. Tal investimento equivale a aproximadamente 15-30% do investimento fixo e a aproximadamente 25% dos investimentos diretos ^{[69].}

Capital de giro é o patrimônio em conta corrente de que necessitam as empresas para atenderem às operações de produção e comercialização de bens, ou seja, é o capital de giro que garante a operacionalização do projeto. São os custos de investimento destinados ao pagamento de salários, à formação de estoque de matérias-primas e de produtos acabados e ao financiamento das vendas. Em média, o capital de giro representa 10 a 20% do investimento fixo ^{[72].}

Os custos de partida da planta são os gastos com as modificações do processo que precisam ser feitos para que a planta possa operar na sua capacidade máxima. Estão envolvidos gastos como com equipamentos e materiais, com a mão-de-obra adicional necessária para o início de operação da planta e a perda de rendimento durante a remoção de imperfeições nas linhas de processamento e para que se possua capital para manter a planta enquanto a mesma está parada ou ainda não está operando na sua capacidade máxima de produção. A faixa sugerida é de 8 a 10% do CIF, para indústrias químicas ^{[70].} Por se tratar de uma indústria biofarmacêutica, considerou-se razoável utilizar 15% do CIF.

Além de todos os custos mencionados anteriormente para a estimativa do investimento total, há outro custo adicional referente à validação dos equipamentos e do processo de produção do medicamento antes da comercialização do produto. Tal custo será considerado equivalente a 15% da aquisição dos equipamentos principais.

O Fator IX recombinante pode ser considerado um biogênico por já existir no mercado mundial um produto baseado em tal proteína, denominado BeneFIX^[77]. Por tal razão, haverá a necessidade da realização apenas do teste de bioequivalência, o qual não irá gerar um montante significativo frente ao investimento fixo.

Para fazer a estimativa do investimento total do projeto foram considerados para o cálculo os valores máximos dos intervalos recomendados na literatura, pois estes dados, em sua maioria, são destinados às indústrias químicas ou petroquímicas. Como o projeto se trata de uma indústria biofarmacêutica os custos serão consideravelmente mais elevados devido às exigências dos órgãos regulatórios, por se tratar de um medicamento injetável para uso humano. Este critério, sendo conservador, evita que a rentabilidade do projeto seja favorecida pelos critérios adotados nesta etapa. O cálculo da estimativa dos custos do investimento total da planta se deu de acordo com a Tabela 47 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 48.

Tabela 47 – Composição dos Custos do Investimento Total^{[69], [70], [71], [72]}.

Item				Custo
Investimento Fixo (CIF)	Investimentos Diretos (ID)	ISBL	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	-	45% do ISBL
	Construção das áreas limpas - GMP	-	Somatório do custo por m ²	
Investimentos Indiretos (II)	-	-	25% do ID	
Custos de Partida (CP)	-	-	-	15% do CIF
Capital de Giro (CG)	-	-	-	15% do CIF
Validação	-	-	-	15% do AE

Tabela 48 – Estimativa dos Custos do Investimento Total.

Estimativa do Investimento Total				
TAG	Aquisição de Equipamentos (AE)	Equipamento	Custo Unitário (R\$)	Custo Total (R\$)
BRT-10001		Biorreator de 9 L	125.740,00	125.740,00
BRT-10002		Biorreator de 42 L	492.553,00	492.553,00
BRT-10003		Biorreator de 210 L	875.796,00	875.796,00
HCL-10001		Hidrociclone	10.000,00	10.000,00
TQE-10001		Tanque de Equalização de 330 L	208.391,00	208.391,00
CAF-20001		Coluna de Afinidade BPG 300/950 + Sistema AKTAprocess	496,28	496,28
CAM-20001		Coluna de Afinidade com Metal Imobilizado AxiChrom 1000/300 + Sistema AKTAprocess	1.110,75	1.110,75
CTA-20001		Coluna de Troca Aniônica BPG 140/500 + Sistema AKTAprocess	469,96	469,96
CTA-20002		Coluna de Troca Aniônica BPG 300/500 + Sistema AKTAprocess	488,95	488,95
MFL-20001		Módulo de Microfiltração de 1,3 m ²	40.000,00	40.000,00
TQD-20001		Tanque de Dialisante de 80 L	136.888,00	136.888,00
TQD-20002		Tanque de Dialisante de 160 L	171.863,00	171.863,00
TQE-20001		Tanque de Equalização de 320 L	206.839,00	206.839,00
TQE-20002		Tanque de Equalização de 20 L	66.937,00	66.937,00
TQE-20003		Tanque de Equalização de 20 L	66.937,00	66.937,00
TQE-20004		Tanque de Equalização de 210 L	185.585,00	185.585,00
TQE-20005		Tanque de Equalização de 85 L	139.947,00	139.947,00
TQE-20006		Tanque de Equalização de 920 L	260.126,00	260.126,00
TQF-20001		Tanque de Formulação de 50 L	113.172,00	113.172,00
TQI-20001		Tanque de Inativação Viral de 70 L	130.150,00	130.150,00
UFL-20001		Módulo de Ultrafiltração de 2,6 m ²	50.000,00	50.000,00
UFL-20002		Módulo de Ultrafiltração de 10,0 m ²	90.000,00	90.000,00
UFL-20003		Módulo de Ultrafiltração de 1,0 m ²	38.000,00	38.000,00
ENV-30001		Envasadora	639.450,00	639.450,00
LIO-30001		Liofilizador	456.750,00	456.750,00
		Custo Total de Equipamentos (AE)		4.507.689,95
	Equipamentos destinados ao Controle de Qualidade		10% da AE	450.768,99
	Instalação de equipamentos		45% da AE	2.028.460,48
	Controle e Instrumentação		30% da AE	1.352.306,98
	Tubulações		80% da AE	3.606.151,96
	Materiais e Equipamentos Elétricos		20% da AE	901.537,99
	ISBL			12.846.916,35
	OSBL		45% do ISBL	5.781.112,36
	Construção das áreas limpas - GMP			1.164.067,14
	Investimentos Diretos		ISBL + OSBL + Construção GMP	19.792.095,84
	Investimentos Indiretos		25% dos investimentos diretos	4.948.023,96
	Investimento Fixo		Investimentos Diretos + Indiretos	24.740.119,80
	Capital de Giro		15% do Investimento Fixo	3.711.017,97
	Custos de Partida		15% do Investimento Fixo	3.711.017,97
	Validação		15% da AE	676.153,49
		INVESTIMENTO TOTAL		32.838.309,23

6.2.2 Custos de Produção

O custo total de produção (CTP) de um projeto pode ser dividido em custo fixo e custo variável.

Custos variáveis são os custos que variam de acordo com o volume de produção, pois este engloba os custos de matérias-primas (10-50% CTP ^[69]) e os custos de utilidades (10-20% CTP ^[69]), que serão maiores ou menores dentro de um período conforme aumente ou diminua a quantidade produzida, interferindo assim no custo variável do processo.

Custos fixos são os custos que possuem um valor previamente fixado, que não sofrerá alterações devido à variação da produção num determinado período. Os custos fixos podem ser divididos em custos desembolsáveis diretos, que são os custos diretamente ligados e de forma exclusiva ao projeto em questão, custos desembolsáveis indiretos, que são os que não são diretamente ligados ao processo e podem ser compartilhados por mais de um projeto, e os custos não-desembolsáveis, constituídos pela depreciação.

Os custos desembolsáveis diretos, que estão ligados à produção, são compostos pelos gastos com mão-de-obra operacional, supervisão e chefia, cargos de laboratório, manutenção e despesas gerais. Os custos desembolsáveis indiretos (impostos, seguros e despesas gerais) não estão ligados à produção, sendo alocados a ela por critério de proporcionalidade ou rateio, quando da fabricação de diferentes produtos em uma mesma planta. Tais custos foram estimados conforme descrito na Tabela 49 ^[69].

Os custos não-desembolsáveis são constituídos pela depreciação, que pode ser entendida como a parcela teórica do desgaste dos equipamentos na fabricação de um produto. Esse valor, embora represente um custo de produção, não se materializa em desembolso ^[73], por esse motivo que a depreciação não fará parte do custo de produção, seu valor será descontado no Fluxo de Caixa feito mais adiante, sendo calculado como 10% do investimento fixo ^[74].

O cálculo da estimativa dos custos totais de produção se deu de acordo com a Tabela 49 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 50.

Tabela 49– Estimativa do Custo Total de Produção (CTP) ^[69].

Item			Custo
Custos Variáveis	Matérias-primas	-	Somatório dos custos das matérias-primas da produção
	Utilidades	-	15% CTP
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 e manutenção
		Impostos e seguros	1,5% IF*

* IF: Investimento Fixo

Tabela 50 – Custo Total de Produção.

Estimativa do Custo Total de Produção (CTP)				
Matérias-primas	Unidade	Preço (R\$/unidade)	Consumo (Unidade/ano)	Custo anual (R\$)
Meio de Cultivo	L	20,00	36.496	729.920,00
Água Destilada	L	0,10	1.040.963	104.096,27
WFI (Water for Injection)	L	0,20	16.989	3.397,80
NaCl	g	0,01	18.032.479	114.145,59
NaOH	g	0,02	1.444.796	27.205,50
TRIS	g	0,62	759.907	469.805,20
Imidazol	g	0,63	615.488	385.603,23
Uréia	g	0,01	9.792.764	104.195,01
Etanol	L	4,46	24.953	111.288,54
CaCl2	g	0,02	22.879	408,17
ácido acético	L	19,04	376	7.159,04
isopropanol	L	5,99	2.626	15.729,74
lauril sarcosinato de sódio (LSS)	L	200,00	263	52.640,00
CuSO4	g	0,02	1.641.650	28.925,88
Polisorbato 80	L	59,35	328	19.466,80
KH2PO4 (fosfato monobásico)	g	0,03	828.512	26.164,41
K2HPO4 (fosfato dibásico)	g	0,03	12.258.272	424.871,71
Na3PO4	g	0,01	1.851.350	27.696,20
Triton X-100	L	299,50	112	33.544,00
TNBP	L	48,64	34	1.653,66
HCl	L	7,84	10	78,40
Histidina	g	6,10	5.025	30.652,50
Glicina	g	0,56	65.203	36.513,68
Sacarose	g	0,02	5.155	79,39
Módulo Membranas MF (1,3 m²)	unidade	1.000,00	2	2.000,00
Módulo Membranas UF (2,6 m²)	unidade	1.500,00	2	3.000,00
Módulo Membranas UF (10,0 m²)	unidade	5.000,00	2	10.000,00
Módulo Membranas UF (1,0m²)	unidade	950,00	2	1.900,00
Resina Q Sepharose FF	L	2.231,98	4	9.575,21
Resina Matrex Cellufine Sulfate	L	4.463,97	45	201.324,91
Resina Ceramic Hydroxyapatite	L	3.347,98	20	67.595,62
Resina Fractogel-EMD-Chelate	L	6.695,95	219	1.467.551,45
Bolsas descartáveis	L (armazenado)	2,00	2.526	5.052,00
Frascos de embalagem	unidade	0,42	388.125	163.388,10
Seringas embalagem	unidade	0,20	388.125	77.625,00
Total de matérias-primas				4.764.253,01
Utilidades	15% do CTP			1.786.594,88
Total de Custos Variáveis				6.550.847,89
Custos Desembolsáveis diretos	Mão-de-obra:			1.429.275,90
	Operação (MOP)		10% do CTP	1.191.063,25
	Supervisão e chefia		10% do MOP	119.106,33
	Cargos de laboratório		10% do MOP	119.106,33
	Manutenção (materiais e mão-de-obra)		4% do ISBL	513.876,65
	Despesas Gerais		45% da mão-de-obra	643.174,16
Total dos custos desembolsáveis diretos				2.586.326,71
Custos Desembolsáveis Indiretos	Despesas Gerais		65% da mão-de-obra e manutenção	1.263.049,16
	Impostos e seguros		1,5% do investimento fixo	371.101,80
Total dos custos desembolsáveis indiretos				1.634.150,96
Total de Custos Fixos				4.220.477,67
CUSTO TOTAL DE PRODUÇÃO				11.910.632,52

6.3 Análise de Viabilidade Econômica

Parte-se do pressuposto de que a viabilização de qualquer projeto começa sempre pelo aspecto econômico. Tendo em vista que a maioria dos problemas de engenharia econômica envolve receitas e despesas que ocorrem em instantes de tempo diferentes, é útil adotar-se uma representação que possibilite comparar diferentes alternativas de maneira realista, levando em consideração o valor temporal do dinheiro. Esta representação é dada pelo diagrama do fluxo de caixa e será apresentada posteriormente ^[74].

A análise de viabilidade econômica é importante para determinar se o projeto em questão irá ou não proporcionar lucros no decorrer de sua vida útil, se evita saldos negativos proporcionando assim um fluxo de caixa positivo em qualquer momento do empreendimento, ou seja, determinar se o investimento a ser feito é válido, avaliando se o projeto é ou não é viável economicamente.

As técnicas mais comuns para a análise da viabilidade econômica são a taxa interna de retorno (TIR), o tempo de retorno do investimento (TR) e o valor presente líquido (VPL), sendo estas três avaliadas neste projeto. Os conceitos destas técnicas serão apresentados detalhadamente a seguir.

Como os métodos anteriores para estimativas do investimento total e do custo total de produção possuem incertezas, assim como a predição de resultados futuros, é necessária uma análise de sensibilidade dos resultados face à variação de parâmetros importantes do fluxo de caixa. Isto é importante para que se analise como se comporta o fluxo de caixa do projeto caso parâmetros, como matérias-primas, investimento e preço, possuam valores diferentes aos previstos nos cálculos e estimativas deste trabalho. Outra técnica de análise muito conhecida e utilizada, denominada ponto de nivelamento, também é analisada neste projeto.

6.3.1 Valor Presente Líquido

Um dos indicadores mais importantes para mensurar a viabilidade financeira de um projeto de investimento é o Valor Presente Líquido (VPL). Este método de avaliação consiste em descontar o fluxo de caixa do projeto à taxa mínima de atratividade e analisar o valor presente líquido obtido com base no seguinte critério de decisão:

$VPL > 0$ – Investimento atrativo

$VPL = 0$ – Indiferente

$VPL < 0$ – Investimento não-atrativo

Taxa Mínima de Atratividade (TMA) é a taxa de juros acima da qual o investidor ou a empresa não considera atrativa a realização do investimento. É importante observar o fato de que a viabilidade do projeto depende da Taxa Mínima de Atratividade. Quando se utiliza uma TMA muito alta o projeto que a uma taxa menor era viável pode acabar se tornando inviável, pois o VPL ficaria negativo e, conseqüentemente, tornaria o investimento não-atrativo. No caso do setor biotecnológico, é usual considerar a taxa mínima de atratividade em 20% ao ano ^[75].

Toda vez que se consegue investir uma quantia exatamente igual à taxa de atratividade, o valor presente do projeto como um todo será nulo. Um VPL positivo significa que as quantias futuras, descontadas à taxa mínima de atratividade, superam o investimento inicial necessário, o que torna atrativa a proposta. O inverso ocorre para valores presentes negativos.

Para este projeto, considerou-se que todo o investimento fixo foi realizado no primeiro ano. Estimou-se uma vida útil do empreendimento de 10 anos, pois se trata de uma planta para produção de um medicamento do qual os portadores de hemofilia do tipo B são dependentes, além de estar sendo aplicada uma tecnologia moderna (fator sanguíneo recombinante) e de esta vida útil ser recomendada na literatura para o setor biotecnológico ^[75].

Para o cálculo do Valor Presente Líquido, foram utilizados os valores do Investimento Total e do Custo Total de Produção estimados anteriormente, a Taxa Mínima de Atratividade igual a 20% ao ano ^[75], a Depreciação correspondendo a 10% dos custos de investimento fixo ^[74] e o Imposto de Renda considerado igual a 40% do lucro após a depreciação. Com a capacidade da planta projetada para a produção de 207 milhões de UI/ano e o preço de venda fixado em R\$0,55/UI (preço determinado após avaliações do preço de venda atual do UI de Fator IX pago pelo governo brasileiro) e todos os dados anteriores foi montado o Fluxo de Caixa do projeto, do qual foi obtido um Valor Presente Líquido de R\$217,4 milhões. Como o valor obtido é positivo, conclui-se que o projeto é viável a uma taxa mínima de atratividade igual a 20% ao ano. Os cálculos são demonstrados na Tabela 51.

Tabela 51 – Fluxo de Caixa do Empreendimento.

Premissas	
Preço de venda do rFIX(R\$/UI)	0,55
Vida útil da planta (anos)	10
Capacidade da planta (milhões de UI/ano)	207
Investimento feito integralmente no primeiro ano	

Projeções do fluxo de caixa (em R\$ mil)								
Ano	Investimento	Receita anual (vendas)	Custo de produção anual	FC1	Depreciação	FC2	Imposto de Renda	FC3
0	-32.838.309			-32.838.309		-32.838.309		-32.838.309
1		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
2		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
3		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
4		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
5		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
6		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
7		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
8		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
9		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213
10		113.850.000	11.910.633	101.939.367	-2.474.012	99.465.356	39.786.142	59.679.213

FC1 - Fluxo de caixa sem considerar a depreciação e antes do Imposto de Renda

FC2 - Fluxo de caixa considerando a depreciação e antes do Imposto de Renda

FC3 - Fluxo de caixa considerando a depreciação e depois do Imposto de Renda

Imposto de Renda (40%)

6.3.2 Tempo de Retorno

Tempo de retorno (TR) é definido como o tempo necessário para recuperar o investimento realizado, ou seja, é o tempo necessário para que o VPL do fluxo de caixa seja igual a zero. Este é um critério de avaliação de viabilidade econômica muito utilizado por ser facilmente calculado e interpretado e por permitir desprezar projetos de maior risco, ou seja, os projetos com o tempo de retorno muito longo. Tem como desvantagem não considerar o fluxo de caixa ao longo de toda vida útil do projeto, desconsiderando os períodos posteriores ao tempo de retorno.

Para o cálculo do Tempo de Retorno, a taxa de juros foi considerada igual a zero, pois desse modo o Tempo de Retorno é calculado facilmente pela divisão do Investimento Total do projeto (R\$32.838.309) e o Lucro obtido anualmente (R\$ 59.679.213). Feito o cálculo, determinou-se que para o projeto em questão o Tempo de Retorno é igual a 0,55 anos, tempo que pode ser considerado muito curto para a recuperação de todo o investimento feito no início do projeto. Como o objetivo é levar o menor espaço de tempo possível para recuperar o investimento, e o tempo calculado é muito curto, o projeto é considerado de baixo risco segundo o critério do Tempo de Retorno.

6.3.3 Taxa Interna de Retorno

Taxa interna de retorno (TIR) é o valor da taxa de juros que anula o valor presente líquido de um fluxo de caixa. Este método consiste no cálculo da taxa interna de retorno do projeto e na comparação desta com a taxa mínima de atratividade. O critério para comparação é:

$TIR > TMA$ – Projeto é viável

$TIR = TMA$ – Indiferente

$TIR < TMA$ – Projeto não é viável

A taxa interna de retorno pode ser vista também como o valor limite da taxa mínima de atratividade para que o projeto seja viável. A diferença entre a TIR e a TMA é interpretada como a margem de segurança para a tomada de decisão. Quanto maior for esse intervalo, maior a segurança do investimento.

Tal método tem como vantagens incorporar variações da receita ao longo do tempo, considerar a variação temporal do valor do dinheiro e permitir que se façam análises de sensibilidade do projeto.

Calculou-se a Taxa Interna de Retorno e o valor obtido foi de 182%. Como o valor obtido é aproximadamente nove vezes maior que o valor da Taxa Mínima de Atratividade utilizada neste trabalho (20% ao ano), o projeto em questão pode ser considerado viável economicamente. Além desta análise, pode ser observado que a diferença entre a Taxa Interna de Retorno e a Taxa Mínima de Atratividade, chamada margem de segurança, é bastante elevada (162%), o que confere maior segurança ao investimento feito no projeto analisado.

6.3.4 Análise de Sensibilidade

Os estudos feitos nas análises de viabilidade econômica (Valor Presente Líquido, Tempo de Retorno e Taxa Interna de Retorno) possuem certa incerteza nos seus cálculos e falta de controle sobre a forma como os eventos irão influenciar o projeto no futuro. Pode ser feita uma previsão sobre o comportamento futuro de certos eventos, mas não se pode determinar exatamente quando e com que intensidade irão ocorrer. Então, para se tratar do risco e incerteza envolvidos nas análises de viabilidade, é utilizada a técnica da Análise de Sensibilidade.

A idéia da Análise de Sensibilidade é verificar quão sensível o VPL (ou o Lucro) a uma variação de um dos componentes do fluxo de caixa. Os parâmetros que, proporcionalmente, provocarem maior variação no VPL do projeto serão classificados como sensíveis.

Os parâmetros que irão sofrer variação nos seus valores são: Investimento, custo de matéria-prima e preço de venda do produto.

Para completar a análise, será feito também o cálculo do ponto de nivelamento do projeto, ou seja, ponto que define a quantidade mínima a ser vendida para que o projeto gere receitas que cubram os custos totais de produção, ou seja, é o ponto onde o lucro do projeto é zerado.

6.3.4.1 Ponto de Nivelamento

Ponto de Nivelamento pode ser considerado como a quantidade mínima que deve ser produzida para fazer com que o Lucro do projeto seja igual a zero, ou seja, como o Lucro é a Receita Total menos o Custo Total de Produção, este será o ponto onde a Receita Total é igual ao Custo Total de produção.

Sabendo que a Receita Total é a quantidade de produto vezes o preço de venda, o Custo Total de Produção é a soma do Custo Fixo e o Custo Variável e o Custo Variável é igual ao Custo Variável unitário vezes a quantidade de produto, calcula-se a quantidade de produto no ponto de nivelamento (QPN) pela seguinte fórmula:

$$QPN = \text{Custo Fixo} / (\text{Preço unitário} - \text{Custo Variável unitário})$$

A planta deste trabalho foi projetada para a produção anual de 207 milhões de UI de Fator IX. Com os valores dos Custos Fixo e Variável e o preço unitário do UI de Fator IX igual a R\$0,55, calculou-se a quantidade de produto no ponto de nivelamento, encontrando um valor de 8,1 milhões, que é a quantidade que precisa ser produzida para cobrir os custos de produção no período de um ano. Como tal quantidade corresponde a aproximadamente apenas 4% da capacidade total da planta projetada, isto significa uma grande margem de segurança em relação ao nível de utilização da planta, de onde se conclui que este projeto é viável.

6.3.4.2 Sensibilidade do lucro em relação ao preço de venda do produto

A análise de sensibilidade em relação ao preço do produto é importante devido ao fato do projeto em questão ser intensivo em custos de produção. Isto justifica a necessidade de gerar uma receita alta para que, mesmo com os gastos de produção elevados, a planta proporcione lucro.

Nesta análise, variou-se apenas o preço de venda da UI de fator IX, mantendo todos os outros componentes do fluxo de caixa fixos, e verificou-se como o lucro se comportava com essas variações (Figura 42). Como pode ser observado na Figura 37, mesmo quando o preço de venda equivale a apenas 25% do preço de venda que foi fixado para a UI de Fator IX (R\$0,55), o projeto continua dando lucro. Esta análise demonstra que mesmo se o preço no mercado do produto sofrer uma queda brusca o empreendimento não dará prejuízo, dando maior segurança ao projeto.

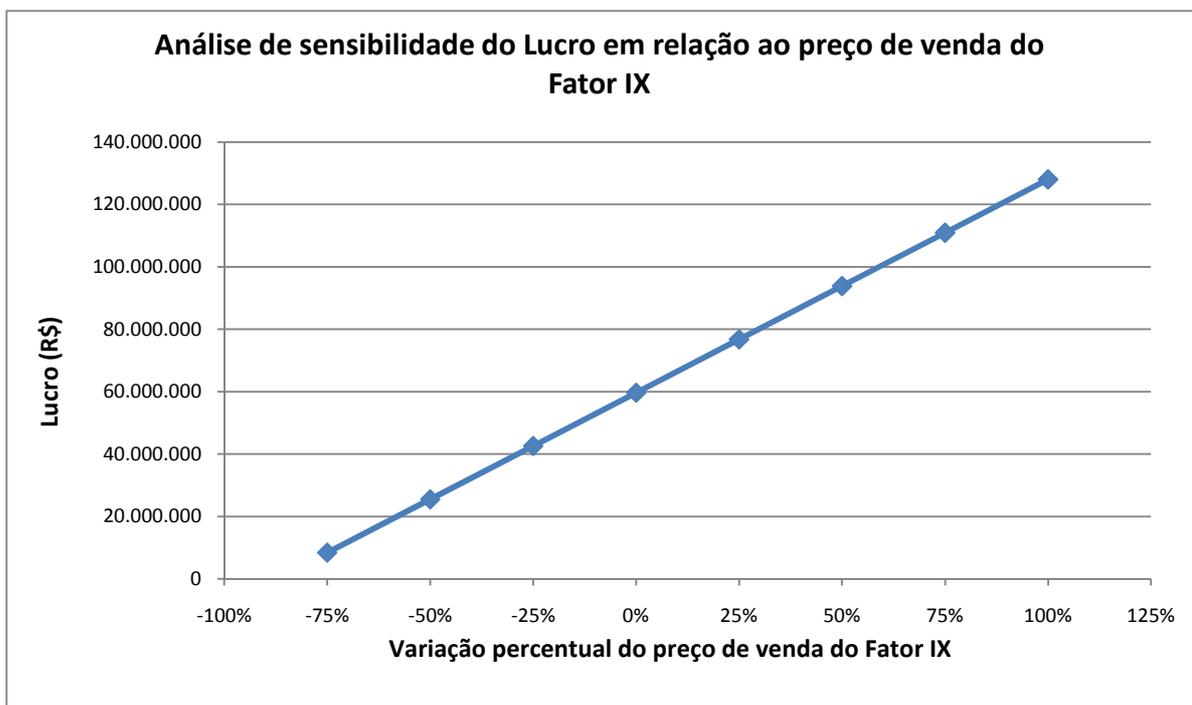


Figura 42. Relação entre Lucro e Preço de Venda do Produto.

6.3.4.3 Sensibilidade do VPL em relação ao investimento

A estimativa do investimento total para o presente projeto foi realizada com base no valor dos equipamentos principais, já que estes representam a maior parcela de um investimento na indústria química. Este método apresenta uma margem de erro de aproximadamente 10%.

Apesar de todos os critérios adotados para tornar a estimativa do investimento total o mais próximo possível da realidade, é importante analisar a possibilidade de o investimento ser diferente do estimado. Para tanto, analisou-se a sensibilidade do VPL em relação ao investimento total. Esta análise pode ser visualizada na Figura 43.

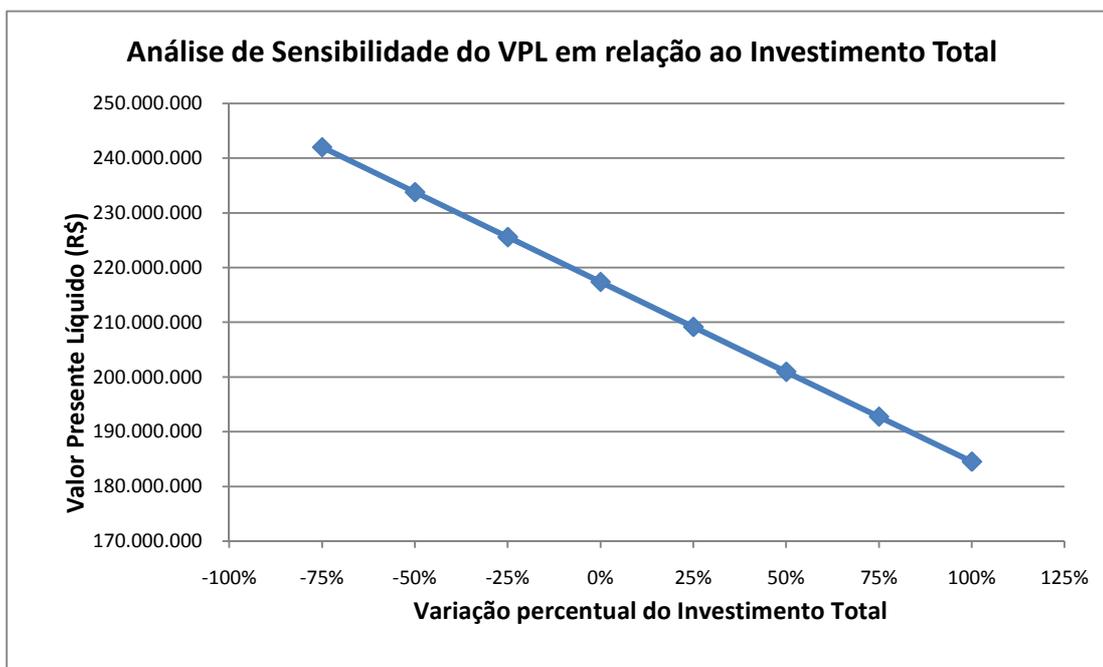


Figura 43. Análise de Sensibilidade do VPL em relação ao Investimento Total.

Analisando o comportamento do Valor Presente Líquido com a variação do Investimento Total, observa-se, pela Figura 43 que, mesmo se o valor do Investimento Total for o dobro do que foi estimado pelos cálculos feitos anteriormente neste trabalho, o Valor Presente Líquido do fluxo de caixa desse projeto continuará positivo, considerando a vida útil de 10 anos e a taxa mínima de atratividade de 20% ao ano. Tal resultado confere uma grande margem de segurança ao projeto, pois mesmo se o Investimento for subestimado, o Valor Presente Líquido continuará sendo positivo, de onde se conclui que o empreendimento continuará sendo viável economicamente mesmo com a variação do Investimento Total.

6.3.4.4 Sensibilidade do VPL em relação ao custo de matérias-primas

Como este projeto é intensivo em custos de produção, justifica-se a necessidade de realizar uma análise de sensibilidade do VPL em relação ao custo das matérias-primas. As análises foram realizadas variando-se o custo das matérias-primas estimado anteriormente de 25 a 200% do seu valor inicial, como mostra a Figura 44.

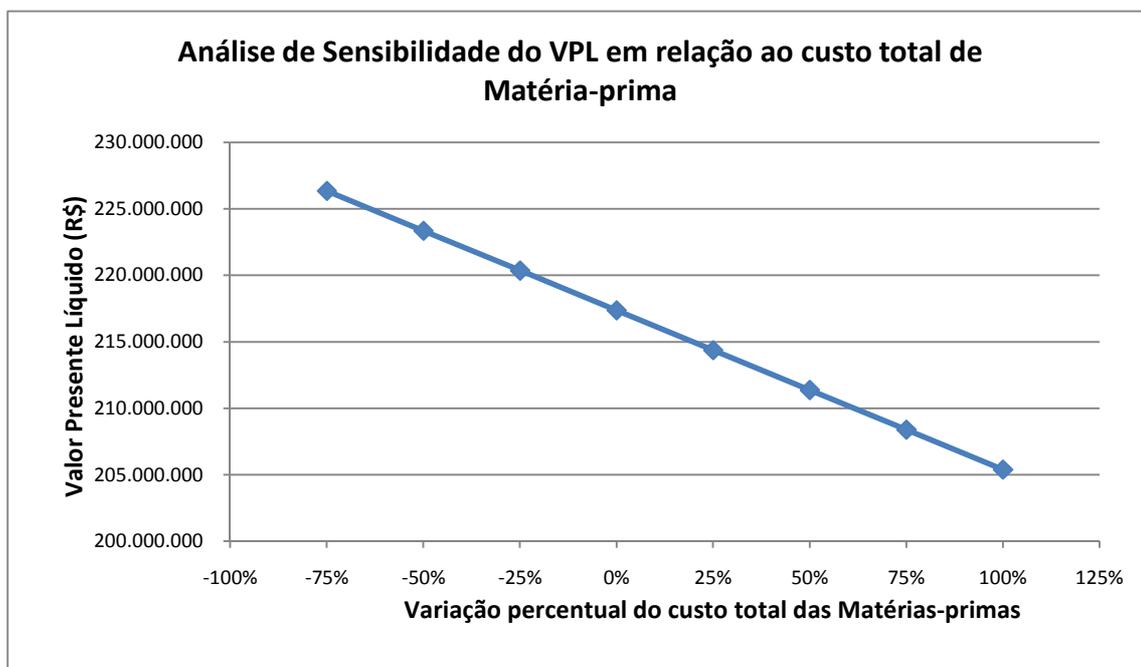


Figura 44. Análise de Sensibilidade do VPL em relação ao Custo Total das Matérias-Primas.

Pela análise da Figura 44, o Valor Presente Líquido continua sendo positivo mesmo quando os gastos com matérias-primas dobram em relação ao custo estimado anteriormente neste trabalho. Conclui-se que mesmo se o preço das matérias-primas sofrer grandes variações e for muito superior aos preços para cada matéria-prima obtidos primeiramente para o projeto, este continuará sendo viável economicamente.

6.3.4.5 Sensibilidade do VPL em relação ao preço de venda do produto

Como já foi feito anteriormente, porém analisando o comportamento do lucro, será verificado dessa vez como o VPL se comporta com a variação do preço de venda do produto. Esta análise é importante para se observar como o Valor Presente Líquido é afetado pela mudança de valor do preço de venda do produto e se mesmo com as variações ele se mantém ou não positivo, para se determinar se o processo continuará ou não sendo viável economicamente. O comportamento do Valor Presente Líquido é observado na Figura 45.

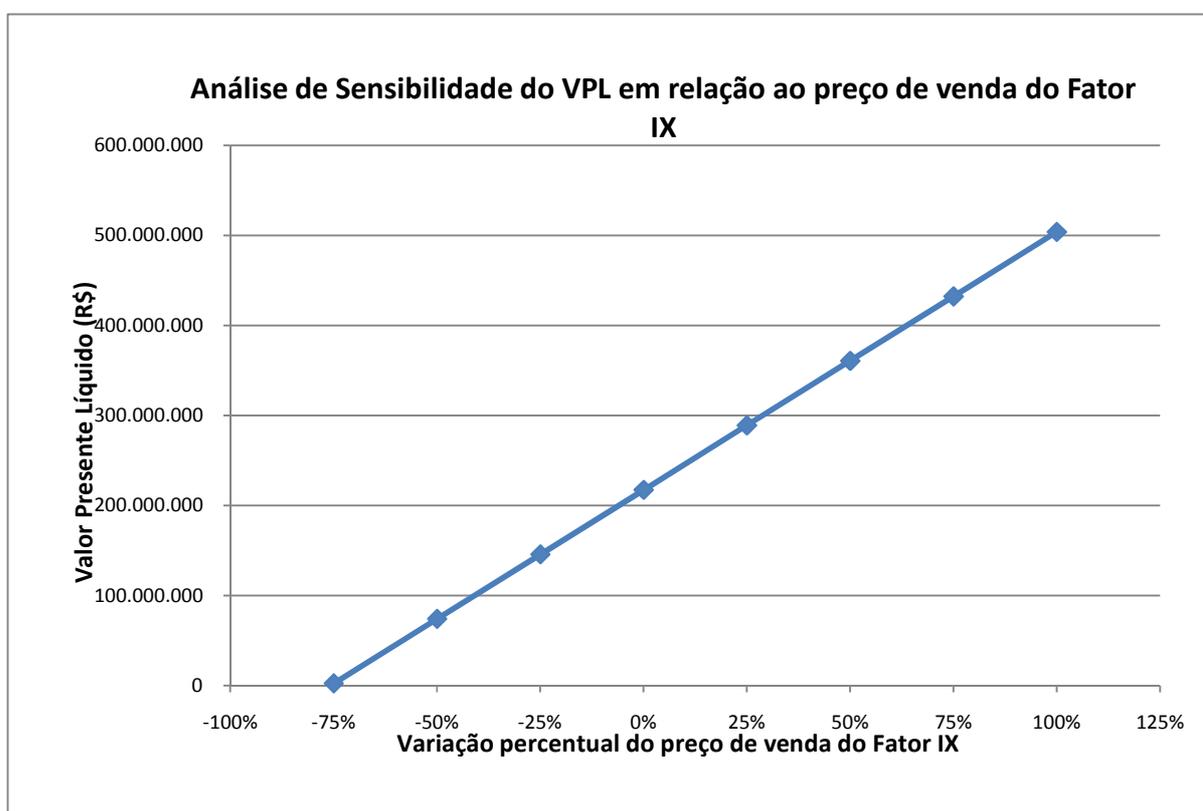


Figura 45. Análise de Sensibilidade do VPL em relação Preço de Venda do Fator IX.

Observa-se, pela Figura 45 que, mesmo quando o preço de venda da unidade do Fator IX cai para apenas 25% do valor fixado inicialmente (R\$0,55), o Valor Presente Líquido do fluxo de caixa se mantém positivo, apesar de estar próximo de zero. A manutenção do valor do VPL positivo mesmo com grande variação por parte do preço de venda do produto confere segurança ao projeto, pois apesar das mudanças ocorridas nos valores dos preços o VPL se mantém positivo até numa queda de 75% no valor do parâmetro analisado.

6.3.4.6 Comparação entre as Análises de Sensibilidade

O objetivo dessa parte do trabalho é de identificar através das análises de sensibilidade realizadas anteriormente qual dos parâmetros que sofreram variações em seu valor inicial (preço de venda da UI de Fator IX, Investimento Total e Custo de Matérias-primas) tem maior impacto no Valor Presente Líquido, ou seja, para qual dos parâmetros citados o VPL possui maior sensibilidade. Para tal, colocou-se em um único gráfico todos os VPL's calculados com a variação dos parâmetros de 25 a 200% de seu valor inicial (Preço de venda R\$0,55, Investimento Total aproximadamente R\$32,8 milhões e Custo de Matérias-primas R\$4,76 milhões) e procurou-se

avaliar qual dos três parâmetros citados anteriormente causa maior inclinação da reta contendo os VPL's. A Figura 46 mostra a comparação dos VPL's obtidos com as análises de sensibilidade.

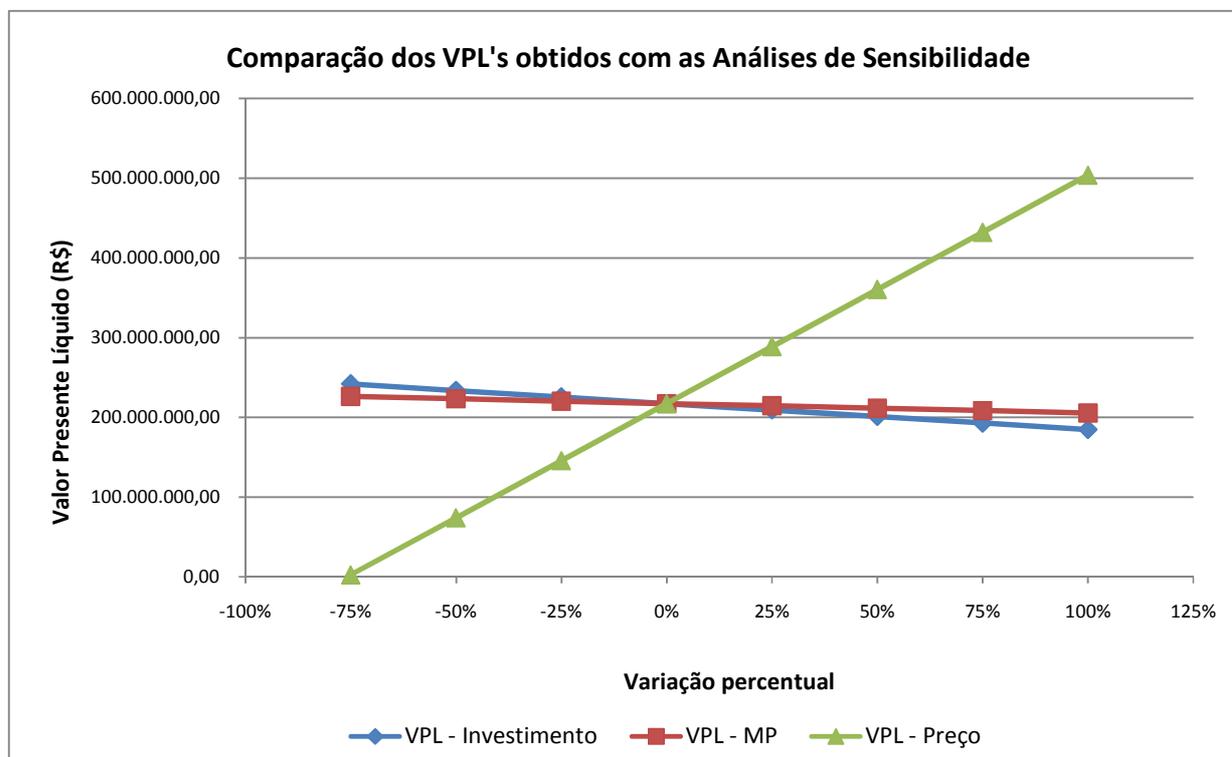


Figura 46. Comparação dos Gráficos das Análises de Sensibilidade Realizadas.

Como pode ser observado na Figura 46, claramente o preço de venda é o parâmetro que causa maior variação no Valor Presente Líquido do fluxo de caixa do projeto. Sendo assim, conclui-se que o Valor Presente Líquido é mais sensível às variações que ocorrem no preço de venda da UI de Fator IX.

Atualmente, todo o Fator IX adquirido pelo Ministério da Saúde para ser utilizado no tratamento da hemofilia tipo B é importado, o que custa aproximadamente 30 milhões de reais para os cofres da União.

Como atualmente cerca de 1300 brasileiros necessitam receber este fator de coagulação sanguínea, que é obrigatoriamente fornecido pelo governo brasileiro, a garantia de venda do Fator IX recombinante produzido até que toda a demanda nacional seja atendida foi um dos fatores mais relevantes para a realização do presente trabalho. Desta forma, foi projetada uma planta para a produção de Fator IX recombinante, cuja capacidade fosse suficiente para atender totalmente a demanda brasileira por este biofármaco, visando ao tratamento profilático e não somente tratamento de episódios hemorrágicos, como é feito atualmente.

O primeiro passo foi estimar a demanda pelo Fator IX para tratamento profilático no ano de 2025, último ano de vida útil do projeto estudado. Conforme os cálculos feitos na análise de mercado com ajuda das projeções de crescimento da população brasileira realizadas pelo IBGE e frequência da ocorrência de hemofilia tipo B na população masculina, a demanda em 2025 foi estimada em 207 milhões de UI. Este trabalho teve como objetivo o dimensionamento de uma planta para atender toda a demanda brasileira pelo produto no ano de 2025, podendo, caso haja excedentes, estes serem comercializados para outros países.

Para o dimensionamento da planta, algumas etapas foram baseadas no processo de produção do fator IX recombinante comercial BeneFIX. Para a síntese do produto foram utilizadas células da linhagem CHO cultivadas em biorreator operando em perfusão com hidrociclone como dispositivo de separação de células. Na análise realizada, partiu-se do pressuposto que já se dispunha desta linhagem de células CHO produtoras de fator IX. Para purificação foram realizados processos cromatográficos e com membranas e, para a inativação viral, o método do solvente e detergente foi empregado. O produto final envasado foi disponibilizado sob a forma de pó com solução tampão para diluição antes da injeção no paciente.

Desenvolvido o método para a produção de Fator IX, foram listados os equipamentos e as matérias-primas utilizadas no processo em questão para cálculo das quantidades utilizadas. Com esses dados e a ajuda de fornecedores para orçamento dos preços unitários de cada um dos equipamentos e das matérias-primas envolvidos no projeto, foi possível estimar os valores do Investimento Total e do Custo Total de Produção, como apresentado no capítulo 6. Tais valores são de extrema importância, uma vez que, a partir deles, o fluxo de caixa do projeto pôde ser construído.

Para os cálculos de viabilidade econômica, foi considerado o preço de venda do Fator IX como sendo R\$0,55/UI (preço médio pago atualmente pela UI importada) e taxa mínima de atratividade igual a 20% ao ano, valor utilizado para indústrias biofarmacêuticas.

Montado o fluxo de caixa, diversas análises foram realizadas e concluiu-se que a construção de uma planta para a produção de Fator IX recombinante no Brasil é viável devido às seguintes razões:

- O lucro anual calculado foi de aproximadamente R\$60 milhões e o valor presente líquido, R\$217 milhões, para uma vida útil da planta de 10 anos;
- O tempo de retorno do investimento feito para implantação do projeto é de aproximadamente sete meses, ou seja, os gastos feitos no investimento são recuperados rapidamente;
- A taxa interna de retorno (TIR) é nove vezes maior que a taxa mínima de atratividade (TMA). Quanto maior o intervalo entre a TMA e a TIR (neste caso 162%, extremamente elevado), maior a segurança conferida ao projeto;
- Quantidade a ser produzida para cobrir os custos de produção anual é aproximadamente 8 milhões de UI, cerca de 4% da capacidade de produção anual da planta, valor muito pequeno e que garante segurança para o projeto;
- Todas as análises de sensibilidade mostraram que, mesmo com as variações dos valores dos parâmetros estudados (preço de venda, investimento total e custo de matérias-primas) de 25 a 200% do valor proposto inicialmente, o lucro e o valor presente líquido do projeto se mantêm positivos, garantindo segurança ao projeto caso ocorram mudanças bruscas nos parâmetros analisados anteriormente e
- O Brasil gasta anualmente 30 milhões de reais com a importação de fator IX, valor muito próximo do estimado para o investimento a ser realizado para implantação do projeto, ou seja, com o que o governo gasta em um ano é possível construir uma planta em território brasileiro para a produção de Fator IX recombinante.

Como observado anteriormente, todas as análises econômicas resultaram em um projeto economicamente viável e com uma margem de segurança que confere ao projeto capacidade de suportar grandes mudanças em diversos aspectos, se mantendo sempre viável. Isto é importante uma vez que, como o tempo de vida útil do projeto desenvolvido é de 10 anos, é impossível prever o comportamento exato de todas as variáveis envolvidas ao longo desse período.

1. Biotechnology, Microsoft Encarta online encyclopedia 2000: <http://encarta.msn.com>, acessado em 02/03/09.
2. <http://www.engr.sjsu.edu/pabacker/biotech.htm>, acessado em 02/03/09.
3. <http://www.webartigos.com/articles/10701/1/a-tecnologia-do-dna-recombinante-e-suas-multiplas-aplicacoes/pagina1.htm>, acessado em 02/03/09.
4. Walsh, G., *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd., England, 1999.
5. Roth, D.A.; Kessler, C.M.; Pasi, K.J.; Rup, B.; Courter, S.G.; Tubridy, K.L., Human recombinant factor IX: safety and efficacy in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrate, *Blood*, v. 105, p. 518-525, 2001.
6. Guyton, A.C.; Hall, J.E., *Tratado de Fisiologia Médica*, 11ª Ed., Elsevier Ltda, 2006.
7. <http://www.fisiologia.ufc.br/Ensino/pedro/hemostasia%20e%20coagulacao%20sanguinea.pdf>, acessado em 03/03/09.
8. http://www.fmrp.usp.br/revista/2001/vol34n3e4/fisiologia_coagulacao.pdf, acessado em 03/03/09.
9. Soares, B.M.D., *Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2002.
10. <http://br.invertia.com/mercados/divisas/>, acessado em 11/09/2009.
11. Sambanis, A.; Hu, W.-S., Cell culture biorreactors. In: *Biothcnology; a multi-volume comprehensive treatise*, Rehm, H.-J.; Reed, G. (eds); 2ª edição; Weinheim, VCH Verlag, v.3, p.105-126, 1993.
12. Butler, M., The characteristics and growth of cultured cells. In: *Buler, M. Mammalian cell biotechnology; a practical approach*, Oxford, Oxford University Press, 1991.
13. Kelley, B.D.; Chio, T.-W.; Rosemberg, M; Wang, D.I.C., Industrial animal cell culture. In: *Biothecnology: a multi-volume comprehensive treatise*, Rehm, H.-J.; Reed, G. (eds); 2ª edição; Weinheim, VCH Verlag, v.3, p.23-38, 1993.
14. Mains, R.E.; Cullen, E.I; May, V.; Eipper, B.A., The role of secretory granules in peptide biosynthesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.493, p.278-291, 1987.
15. Silveira, C.R.; Petrocínio, F.R.M.; Braga, J.S., *Projeto de uma Planta para a Produção de Fator VIII Recombinante*, Projeto Final de Curso, UFRK, Rio de Janeiro, 2005.
16. Handa-Corrigan, A., Bioreactors for mammalian cells. In: *Butler, M. Mammalian Cell Biotechnology: A practical approach*, New York, Oxford University Press, p.138-158, 1991.

17. Medronho, R.A., Produção de Proteínas com Ação Terapêutica, com Foco em Cultura de Células Animais, 2º ENIFarMed, 2008, <http://www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/RicardoMedronhoparte1.pdf> e <http://www.protec.org.br/arquivos/eventos/download/RicardoMedronhoparte2.pdf>, acessado em 19/09/2009.
18. Castilho, L.R., Medronho, R.A., Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures– Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 74; Springer-Verlag, Heidelberg, 2002.
19. Tokashiki M, Yokoyama S., Bioreactor designed for animal cells. In: Hauser H, Wagner R (eds) Mammalian cell biotechnology in protein production. Walter de Gruyter, Berlin, p 279, 1997.
20. Animal cell technology: developments towards the 21st century. Kluwer Academic Pub, Dordrecht, p 671, 1995.
21. Tonso, A., Monitoramento e Operação de Cultivo de Células Animais em Sistemas de Perfusão; Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
22. Lübberstedt M., Medronho R.A., Anspach F.B., Deckwer W-D., Proc Biotechnology, vol 1, Dechema eV, Frankfurt am Main, p 460, 2000.
23. Himmelfarb P.; Thayer P.S.; Martin H.E., Science, v. 164, p. 555, 1969.
24. Zhang S.; Handa-Corrigan A.; Spier R.E., Biotechnol Bioeng v. 41, p. 681, 1993.
25. Berthold W.; Kempken R., Cytotechnology v. 15, p. 229, 1994.
26. Velez D.; Miller L.; Macmillan J.D., Biotechnol Bioeng v. 33, p. 938, 1989.
27. van Reis R.; Leonard, L.C.; Hsu C.C., Builder S.E.: Biotechnol Bioeng v. 38, p. 413, 1991.
28. Vogel J.H.; Kroner K.H., Biotechnol Bioeng v. 63, p. 663, 1999.
29. Kempken R.; Rechtsteiner H.; Schäfer J.; Katz U; Dick O.; Weidemeier R.; Sellick I, In: Carrondo MJT (ed) Animal cell technology, Kluwer, Dordrecht, p. 379, 1997.
30. Castilho, L.R.; Anspach F.B.; Anspach F.B., Proc Biotechnology, vol 4, Dechema eV, Frankfurt am Main, p. 252, 2000.
31. Pui, P.W.S.; Trampler, F.; Sonderhoff, A.S.; Gröschl, M.; Kilburn, D.G.; Piret, J.M., Biotechnol Prog 11:146, 1995.
32. http://images.quebarato.com.br/photos/big/A/6/12B5A6_1.jpg, acessado em 17/07/2009.
33. <http://www.quimica.ufscar.br/ignez/Aula08-extracao-3D-08-10-07.pdf>, acessado em 17/07/2009.

34. <http://deqb.ist.utl.pt/bbio/67/pdf/Cromatografia%20de%20Afinidade%20com%20metal%20Oimobilizado.pdf>, acessado em 17/07/2009.
35. www.enq.ufrgs.br/cursos/index.php?dir=grad/BioEng/&file...v, acessado em 17/07/2009.
36. Pharmacia Biotech. **Protein Purification Handbook**. Suíça, p.97, 1999.
37. <http://www.quimica.ufscar.br/ignez/Aula08-extracao-3D-08-10-07.pdf>, acessado em 17/07/2009
38. Cursos Práticos em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, 2006.
39. http://pt.wikipedia.org/wiki/Processo_de_separa%C3%A7%C3%A3o_por_membranas, acessado em 12/08/2009.
40. Zuñiga, A.D.G; Pereira, J.A.N; Coimbra, J.S.R; Minim, L.A.; Rojas, E.E.G., Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas, B.CEPPA, Curitiba, v.1, p. 61-82, 2003.
41. Fane, A.G.; Radovich, A.M., Membrane systems, In: Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcel Dekker, p. 209-262, 1990.
42. Habert, A. C.; Borges, C. P.; Nobrega, R., Processos de Separação por Membranas. Rio de Janeiro, E-papers, p.13-19, 47, 2006.
43. Brown, A.P.; Harrison, A.B.; Betts, W.B., O'Neil, J.G., Microbios 91:55, 1997.
44. Modler, W.; Kraus, M., Method of Isolating Blood-clotting Factor IX, United States Patent, 5061789, 1991.
45. Herring, S., W., Purification of Factor IX, United States Patent 5286849, 1994.
46. Roberts, P. L.; Dunkerley C., Effect of manufacturing process parameters on virus inactivation by solvent-detergent treatment in a high-purity factor IX concentrate, Bio Products Laboratory, Elstree, UK, 2003.
47. Foster, W., H.; Costigan, R., J.; Bonam, D.; Switzer, M., B.; Walsh, R., Factor IX Purification Methods, United States Patent, 66277337, 2003.
48. Kaufman, R., J.; Shoemaker, C., B., Wasley, L., C., High yield production of active Factor IX, United States Patent, 4770999, 1998.
49. Walsh, G.; Murphy, B., Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective; Kluwer Academic Publishers, Holanda - 1999
50. http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/dna/parte10, acessado em 15/02/2009.
51. www.ibge.gov.br/, acessado em 27/03/2009.

52. Kaufman, R.J.; Wasley, L.C.; Furie, B.C.; Furie, B.; Shoemaker, C.B., Expression, Purification, and Characterization of Recombinant γ -Carxylated Factor IX Syntethized in Chinese Hamstyer Ovary, In: The Journal of Biological Chemistry, v. 261, p. 9622-9626, USA, 1986.
53. <http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u465204.shtml>, acessado em 11/09/2009.
54. <http://www.pam-membranas.com.br>, acessado em 10/08/2009.
55. Protein Concentration and Diafiltration by Tangencial Flow Filtration; Millipore Corporation, Billerica, USA, 2003.
56. Castilho, L.R., Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells, Tese de Doutorado, Technische Universität Braunschweig 2001.
57. Heaton, C.A., An Introdution to Industrial Chemistry, Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1991.
58. Rodrigues, S.L.C.; Moreira, R.L.S.; Cardoso. M.H.; Merçon, F., Avaliação de Parâmetros de Ultrafiltração de Suco de Banana; Ciên. Tecnol. Aliment.; Campinas; 23 (Supl), 2003.
59. Yu-Kaung Chang , Jim-Tong Horng, Ren-Ze Huang and Shiuan-Yaw Lin, Direct recovery of clotting factor IX from unclarified human plasma by expanded bed ion exchange chromatography, Chang Gung University, Tao-Yuan, Taiwan - 2006.
60. Matejtschuk, P., Affinity separations: a practical approach, PAS, Oxford University Press, New York, USA, 1997.
61. Rivat, C.; Stoltz, J.F., Biotechnology of blood proteins, purification, clinical and biological applications, France, 1993.
62. Roberts, P.L., Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII; Biologicals, v. 36, p. 330-335, 2008.
63. Informações Técnicas sobre o BeneFIX; [http://www.medicines.ie/medicine/12772/SPC/BeneFIX+\(Reformulated\)/](http://www.medicines.ie/medicine/12772/SPC/BeneFIX+(Reformulated)/), acessado em 25/08/2009.
64. <http://www.vgdusa.com/10mL-vials.htm>, acessado 05/09/2009.
65. <http://www.fisiostore.com.br/seringa-descartavel-10-ml-sem-agulha-bico-slip-esteril-cx-100-un--descarpack,product,DESC-32050,513.aspx>, acessado em 05/09/2009.
66. www.bausch-stroebel.com/html/engl/frames/frame.html, acessado em 06/09/2009.
67. http://pt.vwr.com/app/Header?tmpl=/vwr_programs/controlled_environment/cleanroom_classification.htm, acessado em 12/09/2009.
68. www.fcf.usp.br/Departamentos/FBT/HP.../Sala%20Limpa.pdf, acessado em 12/09/2009.

69. Peters, M. S., Timmerhaus, K.D., Plant Design and Economics for Chemical Engineers, 4a Ed., Mc Graw Hill International Editions, Nova York, 1991.
70. Ferreira, J.S.G., Castilho, L.R., Paiva, S.P., Produção de Pectinases para a Indústria de Bebidas, Projeto Final de Curso, EQ/ UFRJ, Rio de Janeiro, 1995.
71. Douglas, J. M., Conceptual Design of Chemical Processes, Mc Graw Hill Book Company, Nova York, 1998.
72. Martins, J.V.B., Apostila de Planejamento e Avaliação de Projetos, EQ/UFRJ. 2003.
73. Clemente, A., Projetos Empresariais e Públicos, Ed. Atlas S.A., São Paulo, 1998.
74. Hess, G., Marques, J.L., Paes, L. C.R., Puccini A., Engenharia Econômica, 4a Ed., Fórum Editora Ltda, Rio de Janeiro, 1974.
75. Stewart, J.J., Allison, P.N., Johnson, R.S., Putting a price on biotechnology, Nature Biotechnology, v. 19, p.813-817, 2001.
76. Brito, E., A.; Favaretto, J. A., Biologia: Uma abordagem evolutiva e ecológica, 1ª ed, v. 3, p. 150, São Paulo, 2002.
77. <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/faq/cidadao.htm>, acessado em 12/09/2009.

9.1 Equações e Cálculos para o Dimensionamento do Biorretor em Perfusão

- Cálculo da massa de Fator IX recombinante ativo a ser produzida em 1 ano

$$m \text{ rFIX ativo (g/ano)} = \frac{P \text{ (milhões UI)}}{a \left(\frac{\text{UI}}{\mu\text{g rFIX ativo}} \right)} = 19987,2 \quad (\text{I})$$

Na equação (I), m rFIX ativo é a massa de fator IX recombinante ativo, P é a produção de UIs de fator IX anual e a é a atividade específica de fator IX recombinante ativo.

- Cálculo da massa de Fator IX recombinante ativo a ser produzida diariamente

$$m \text{ rFIX ativo (g)} = \frac{m \text{ rFIX ativo (g/ano)}}{\text{dias de operação}} = 99,94 \quad (\text{II})$$

Na equação (II), m rFIX ativo é a massa de fator IX recombinante ativo.

- Cálculo do volume operacional e de projeto de BRT-10003

Produtividade de 10^6 células

$$\text{product } 10^6 \text{ células} = 17 \mu\text{g rFIX ativo/dia}$$

Produtividade da concentração de células em perfusão

$$\text{product } 2 * 10^7 / \text{mL} = 340 \mu\text{g rFIX} \frac{\text{ativo}}{\text{dia} * \text{mL}}$$

Volume de Perfusão

$$\text{Volume de Perfusão (L)} = \frac{m \text{ rFIX ativo (g)}}{\text{product} \frac{2 * 10^7 \text{ células}}{\text{mL}}} * 1000 = 293,93 \quad (\text{III})$$

Na equação (III), m rFIX ativo é a massa de fator IX recombinante ativo e product $2 * 10^7$ células/mL é a produtividade da concentração de células em perfusão.

$$\text{Volume Operacional (L)} = \frac{\text{Volume Perfusão (L)}}{2 \text{ vvd}} = 147 \quad (\text{IV})$$

Na equação (IV), vvd é o número de meios de cultivo por dia

$$\text{Volume de Projeto (L)} = \frac{\text{Volume Operacional (L)}}{0,7} = 210 \quad (\text{V})$$

Na equação (V), 0,7 corresponde à porcentagem de BRT-10003 utilizada.

9.2 Equações para o Dimensionamento de Biorreatores e Spinners em Batelada

Quantidade de células a ser inoculada

$$\begin{aligned} \text{Quantidade de células a ser inoculada} & \left(\frac{\text{célula}}{\text{L}} \right) \\ & = \text{Volume do equipamento a ser inoculado (L)} \\ & * \text{Concentração de inoculação} \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) * 1000 \end{aligned}$$

Volume operacional do dispositivo de cultivo celular para inoculação

$$\begin{aligned} \text{Volume do dispositivo de cultivo para inoculação (L)} \\ \text{Conc. de células em Batelada} \\ = \frac{\text{Quantidade de células a ser inoculada}}{1000} \end{aligned}$$

Volume de projeto do dispositivo de cultivo celular para inoculação

$$\begin{aligned} \text{Volume de Projeto do dispositivo para inoculação (L)} \\ = \frac{\text{Volume do dispositivo de cultivo para inoculação (L)}}{\% \text{ utilizada}} \end{aligned}$$

9.3 Equações para o Dimensionamento de Biorreatores e Spinners em Batelada

Cálculo do volume de concentrado

$$\text{Volume de Concentrado (L)} = \frac{\text{Volume de alimentação (L)}}{\text{Fator de concentração volumétrica}} \quad (\text{VI})$$

Balço de massa para cálculo do volume de permeado

$$\text{Volume de Permeado (L)} = \text{Volume da Alimentação (L)} - \text{Volume de concentrado (L)} \quad (\text{VII})$$

Cálculo das vazões

$$\text{Vazão} \left(\frac{\text{L}}{\text{h}} \right) = \text{Volume/Tempo} \quad (\text{VIII})$$

Cálculo da área da membrana

$$A(m^2) = \frac{\text{Volume permeado (L)}}{\text{Fluxo permeado} \left(\frac{L}{h m^2} \right) * \text{tempo}(h)} \quad (\text{IX})$$