



**Avaliação de uma planta de produção do
biofármaco Fator VIII recombinante
empregando um simulador de processos**

Valter Silva Couto

Projeto Final de Curso

Orientadoras

Aline Machado de Castro, D.Sc.

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Dezembro de 2010

AVALIAÇÃO DE UMA PLANTA DE PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO FATOR VIII RECOMBINANTE EMPREGANDO UM SIMULADOR DE PROCESSOS

Valter Silva Couto

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

Aprovado por:

Prof. Luiz de Melo Amorim Filho, M.Sc.

Dr^a. Maria Candida Maia Mellado, D.Sc.

Dr^a. Paola Romina Amable, D.Sc.

Prof. Ricardo de Andrade Medronho, Ph.D.

Orientado por:

Dr^a. Aline Machado de Castro, D.Sc.

Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Dezembro de 2010

Couto, Valter Silva.

Avaliação de uma planta de produção do biofármaco Fator VIII recombinante empregando um simulador de processos / Valter Silva Couto. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

x, 90 f.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010. Orientadoras: Aline Machado de Castro e Leda dos Reis Castilho.

1. Fator VIII recombinante. 2. Simulação de processo. 3. Análise econômica. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Aline Machado de Castro, D.Sc. e Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing. I. Título.

Para Igrayne.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste projeto marca para mim o término de uma verdadeira jornada, durante a qual foi fundamental o apoio da minha família e dos meus amigos, dos brilhantes companheiros da Escola de Química, dos professores e funcionários desta Instituição e de todos com quem tive o prazer de conviver na iniciação científica e estágio.

Também quero agradecer a todos que contribuíram com experiência e informações essenciais para este trabalho: aos pesquisadores e técnicos do LECC, aos funcionários do Ministério da Saúde, da Hemobrás, da Sigma-Aldrich e da Federação Brasileira de Hemofilia, assim como a todos os autores citados neste projeto, por dividirem com o mundo o conhecimento adquirido com seu trabalho.

Por fim, agradeço às minhas orientadoras pelo inestimável aprendizado e dedicação durante a realização deste projeto final.

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

**AVALIAÇÃO DE UMA PLANTA DE PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO
FATOR VIII RECOMBINANTE EMPREGANDO UM SIMULADOR DE
PROCESSOS**

Valter Silva Couto

Dezembro, 2010

Orientadoras: Aline Machado de Castro, D.Sc.
Prof^a. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

O presente trabalho apresenta o projeto e a simulação de um processo de produção de Fator VIII recombinante (rFVIII), com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica de uma planta industrial, cuja capacidade seja suficiente para atender a demanda da população brasileira para este biofármaco.

O Fator VIII recombinante é utilizado em terapias de reposição para indivíduos com hemofilia do tipo A, uma coagulopatia hereditária caracterizada pela deficiência ou anormalidade deste fator de coagulação sanguínea, que, junto a outros componentes do sistema de coagulação, atua na contenção de sangramentos em vasos danificados.

A hemofilia do tipo A é a coagulopatia hereditária com maior número de diagnósticos. Atualmente, o Ministério da Saúde é responsável pela importação e distribuição do Fator VIII para cerca de 8.500 hemofílicos do tipo A, com um custo de cerca de 80,5 milhões de dólares por ano.

Utilizando-se uma ferramenta computacional, o simulador de processos *SuperPro Designer*[®], avaliou-se a viabilidade do empreendimento, comparando-se os resultados obtidos para o processo proposto com aqueles de outros cenários possíveis. Entre as variáveis avaliadas estão a atividade específica da proteína de interesse e o nível de expressão de rFVIII pela linhagem celular utilizada. Foram também avaliadas variações nos aspectos econômicos do processo, tais como preço de venda do produto e custo de matérias-primas.

O processo proposto mostrou-se altamente viável e bastante vantajoso com um investimento total estimado em 23,5 milhões de dólares para uma capacidade de 800 milhões de UI de rFVIII por ano, oferecendo lucro líquido anual de 96,5 milhões de dólares e taxa interna de retorno de 232 %.

Abstract of Graduation Final Project presented to Escola de Química as a part of the requirements for obtaining the degree of Chemical Engineer.

**EVALUATION OF A PLANT FOR MANUFACTURING THE
BIOPHARMACEUTICAL RECOMBINANT FACTOR VIII USING A
PROCESS SIMULATOR**

Valter Silva Couto

December, 2010

Supervisors: Aline Machado de Castro, D.Sc.
Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.

The present work presents the project and simulation of a process for the production of recombinant Factor VIII (rFVIII), aiming to evaluate the economic viability of an industrial plant, designed to have a capacity sufficient to meet the demand of the Brazilian population for this biopharmaceutical.

Recombinant Factor VIII is used in replacement therapies for individuals with hemophilia A patients. Hemophilia A is an inherited coagulopathy characterized by the deficiency or abnormality of this blood coagulation factor, which acts in combination with other components of the coagulation system to contain blood loss in damaged vessels.

Hemophilia A is the inherited coagulopathy with the highest number of diagnostics. Presently, the Brazilian Ministry of Health is responsible for importing and distributing Factor VIII to about 8,500 hemophiliacs, at a total cost of about 80.5 million US dollars each year.

By using a computational tool, the process simulator *SuperPro Designer*[®], the economic feasibility of the project was assessed and the results obtained for the base case were compared to those of other possible scenarios. The specific activity of the protein of interest and the FVIII expression level of the recombinant cell line are among the evaluated variables. Variations in the economic aspects of the process, such as the product selling price and the raw materials costs were also evaluated.

The proposed process proved to be highly feasible and quite advantageous, requiring a total investment estimated in 23.5 million US dollars for a production capacity of 800 million IU of rFVIII per year, providing an annual net profit of 96.5 million US dollars and an internal return rate of 232 %.

SUMÁRIO

I. Introdução.....	1
II. Revisão bibliográfica.....	5
II.1. Análise de mercado.....	5
II.2. Processos de produção de Fator VIII recombinante.....	7
II.2.1. Sistema de expressão.....	8
II.2.2. Composição do meio de cultura.....	9
II.2.3. Sistema de cultivo celular.....	10
II.2.4. Purificação.....	11
II.2.5. Inativação viral.....	12
II.2.6. Formulação.....	13
II.3. Simuladores de bioprocessos.....	14
II.4. Avaliação econômica de processos.....	18
III. Metodologia de simulação do processo de produção de Fator VIII recombinante.....	25
III.1. Descrição do processo proposto.....	25
III.1.1. Propagação do inóculo.....	25
III.1.2. Cultivo em perfusão.....	27
III.1.3. Microfiltração.....	27
III.1.4. Cromatografia de troca catiônica.....	28
III.1.5. Inativação viral.....	30
III.1.6. Diafiltração.....	30
III.1.7. Cromatografia de imunoafinidade.....	30
III.1.8. Cromatografia de troca aniônica.....	31
III.1.9. Formulação.....	32
III.1.10. Liofilização.....	33
III.2. Modelagem das etapas do processo.....	34
III.2.1. Biorreatores.....	34
III.2.2. Hidrociclone.....	36
III.2.3. Microfiltração.....	38
III.2.4. Cromatografia.....	38
III.2.5. Diafiltração.....	39
III.2.6. Liofilização.....	39
III.3. Procedimento de Simulação.....	39
III.4. Análise econômica.....	58

IV. Resultados.....	63
IV.1. Determinação da capacidade da planta.....	63
IV.2. Determinação dos parâmetros estequiométricos.....	65
IV.3. Resultados da simulação.....	67
IV.4. Análise de viabilidade econômica.....	71
IV.5. Análises de sensibilidade.....	76
V. Conclusões e Sugestões.....	82
Referências Bibliográficas.....	84
Anexos.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de coagulação recombinante licenciados.....	7
Tabela 2. Níveis de estimativas de projetos.....	18
Tabela 3. Dados das etapas da operação da coluna de troca catiônica.....	29
Tabela 4. Dados das etapas da operação da coluna de imunoafinidade.....	31
Tabela 5. Dados das etapas da operação da coluna de troca aniônica.....	32
Tabela 6. Formulação do Kogenate®FS.....	33
Tabela 7. Componentes e misturas registrados.....	41
Tabela 8. Projeção da demanda para produção de rFVIII.....	64
Tabela 9. Dados globais do processo.....	67
Tabela 10. Identificação, quantidade, capacidade e custos dos equipamentos adotados, apresentados na ordem em que aparecem no fluxograma do processo.....	69
Tabela 11. Resumo dos investimentos diretos e indiretos (valores em USD).....	71
Tabela 12. Resumo dos custos de produção.....	72
Tabela 13. Resumo dos custos com matérias-primas.....	73
Tabela 14. Resumo dos custos com consumíveis.....	74
Tabela 15. Principais indicadores econômicos do processo.....	75
Tabela 16. Projeções do fluxo de caixa (em USD 1.000,00).....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do Fator VIII humano nativo.....	8
Figura 2. Fluxograma do processo.....	26
Figura 3. Diálogo de especificação do modo de operação.....	40
Figura 4. Diálogo de registro de componentes.....	42
Figura 5. Diálogo de edição das propriedades do componente.....	43
Figura 6. Especificação das operações de um procedimento unitário.....	45
Figura 7. Fluxograma com correntes contínuas e discretas.....	46
Figura 8. Parâmetros do procedimento unitário.....	47
Figura 9. Dimensionamento do hidrociclone.....	49
Figura 10. Especificação das condições de operação do hidrociclone.....	50
Figura 11. Configuração de agendamento de operações.....	51
Figura 12. Opções de agendamento do processo.....	52
Figura 13. Configuração da operação de microfiltração.....	52
Figura 14. Dimensionamento das colunas cromatográficas.....	54
Figura 15. Configuração da operação de equilíbrio.....	54
Figura 16. Configuração da operação de aplicação da amostra.....	55
Figura 17. Configuração da operação de eluição.....	55
Figura 18. Dados da corrente 212, que sai da coluna de troca aniônica.....	58
Figura 19. Diálogo de classificação das correntes.....	60
Figura 20. Definição dos parâmetros da avaliação econômica.....	60
Figura 21. Diálogo de ajuste das opções de custos de investimento para a seção 'Perfusão' ...	61
Figura 22. Sumário executivo do projeto com os principais indicadores econômicos.....	62
Figura 23. Gráfico de ocupação dos equipamentos.....	68
Figura 24. Gráfico do ponto de nivelamento.....	76
Figura 25. Relação entre lucro e preço de venda do produto.....	77
Figura 26. Análise de sensibilidade em relação à atividade específica do rFVIII.....	78
Figura 27. Análise de sensibilidade em relação ao preço do meio de cultura.....	79
Figura 28. Análise de sensibilidade em relação ao preço da resina de imunoafinidade.....	80
Figura 29. Análise de sensibilidade em relação ao nível de expressão.....	80

I. INTRODUÇÃO

O presente trabalho apresenta o projeto e a simulação de um processo de produção de Fator VIII recombinante (rFVIII), com o objetivo de avaliar a viabilidade econômica de uma planta industrial cuja capacidade seja suficiente para atender a demanda da população brasileira para este biofármaco.

O rFVIII é um fármaco utilizado em terapias de reposição para indivíduos com hemofilia do tipo A, também conhecida como hemofilia clássica. A hemofilia é uma coagulopatia hereditária caracterizada pela deficiência ou anormalidade dos fatores de coagulação sanguínea, em sua maioria proteínas, que atuam na manutenção da hemostase, ou seja, na contenção de sangramentos em vasos danificados (Silveira *et al.*, 2005).

Como ponto de partida para a elaboração deste trabalho, foi tomado o Projeto de Conclusão do Curso de Engenharia Química realizado por Silveira *et al.* (2005), nesta Instituição. No referido trabalho, com base em dados da literatura e em conhecimentos acumulados no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares do PEQ/COPPE/UFRJ, as autoras propuseram um processo de produção de rFVIII baseado no cultivo de células CHO (*chinese hamster ovary cells* - células de ovário de hamster chinês) em modo contínuo com reciclo celular (perfusão), utilizando hidrociclones como equipamentos de retenção das células. As etapas de purificação propostas resultaram em rendimento global de 43 %.

No presente trabalho, uma análise aprofundada do processo proposto pelas autoras citadas, incluindo a avaliação de diferentes cenários, será realizada utilizando-se uma ferramenta computacional (*SuperPro Designer*[®], versão 6.0, edição *Academic Site*, da empresa Intelligen, Inc. – SPD). O uso do SPD nesta avaliação facilita tal análise comparativa entre diversos cenários.

O processo de coagulação do sangue é descrito detalhadamente em Silveira *et al.* (2005). De maneira simplificada, três fases constituem o processo hemostático, devendo ocorrer em conjunto para a adequada formação do coágulo e, conseqüentemente, para a contenção da hemorragia:

- a *fase vascular*, mediada pelo sistema nervoso autônomo, que resulta em vasoconstrição direta da área dos vasos sanguíneos danificados, reduzindo a perda de sangue;

- a *fase plaquetária*, que ocorre pela ativação de plaquetas pelas proteínas subendoteliais, resultando na adesão de plaquetas ao local da lesão; e
- a *fase de coagulação*, que envolve um complexo sistema de coagulação, da qual participam diversos fatores e co-fatores de coagulação e da qual resulta uma rede de fibrina, estabilizando o trombo plaquetário.

A deficiência no fator de coagulação VIII, também conhecido como fator anti-hemofílico, caracteriza a hemofilia do tipo A. Esta condição é classificada de acordo com o nível de atividade coagulante do Fator VIII no plasma sanguíneo. Considerando a definição internacionalmente aceita de que uma unidade internacional de atividade (UI) de FVIII corresponde à atividade encontrada em um 1 mL de plasma sanguíneo em indivíduos normais, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda classificar como pacientes graves aqueles que possuem atividade de FVIII no plasma inferior a 0,01 UI mL⁻¹ (ou < 1 %); moderados aqueles que possuem entre 0,01 e 0,05 UI mL⁻¹ (1 % a 5 %); e leves aqueles que possuem entre 0,05 e 0,40 UI mL⁻¹ (MS, 2006).

A hemofilia A é transmitida de modo recessivo ligado ao cromossomo X, sendo, portanto, mais comum em homens. A prevalência é estimada em 1:10.000 homens. É a coagulopatia hereditária mais comum, correspondendo, no Brasil, a 62,30 % dos diagnósticos em 2007, segundo dados do Ministério da Saúde (MS, 2008)⁽¹⁾.

O tratamento da hemofilia A consiste em terapias de reposição, por administração de concentrados de Fator VIII obtidos por fracionamento do plasma ou pela utilização de células animais geneticamente modificadas para produção de Fator VIII recombinante. Este último método de obtenção tem se tornado preferencial devido ao fato de ser independente do plasma de doadores .

Na produção de concentrados de fator VIII derivados do plasma (pdFVIII), o Fator VIII nativo é fracionado do sangue de doadores, após análise quanto à presença de vírus, por meio de um dos vários processos de fracionamento existentes. O produto final é filtrado, esterilizado, sendo armazenado em frascos e, então, liofilizado. Os frascos são subsequentemente lacrados a vácuo ou preenchidos com gás inerte (por exemplo, N₂), e estocados a temperaturas abaixo de 8 °C até o momento do uso (Walsh, 2003).

1 De fato, a coagulopatia de maior prevalência é a doença de von Willebrand. De acordo com Amorim Filho (2010), a prevalência é de 1:100 nascimentos, mas é de difícil diagnóstico e apenas 5% dos casos são do tipo mais grave.

O Fator VIII recombinante é obtido a partir de células de mamíferos transfectadas com o gene humano. Industrialmente, são usadas linhagens de células CHO ou BHK (*baby hamster kidney cells* - células de rim de hamster neonato), pois as mesmas são capazes de sintetizar de forma adequada a molécula de FVIII, a qual é muito grande e altamente glicosilada (Bödeker, 2006).

A molécula de Fator VIII é dividida em seis domínios: três domínios A, dois domínios C e um domínio B, com 3 pequenos domínios acídicos a1, a2, e a3 separando os domínios A. Esses domínios estão organizados na sequência: NH₂-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2-COOH. No organismo, o FVIII consiste em um heterodímero, formado por uma cadeia leve de 80 kDa (domínios a3-A3-C1-C2) e uma cadeia pesada de 90-210 kDa (domínios A1-a1-A2-a2-B), e contém sítios de interação com outros fatores de coagulação, com fosfolípídeos e com íons metálicos (Amable, 2008).

Através da deleção do maior domínio (domínio B), que não está presente na forma ativada do Fator VIII, foi possível obter uma molécula ativa de menor tamanho, composta de uma cadeia leve de 80 kDa associada a uma cadeia pesada de 90 kDa. São disponibilizados no mercado, hoje em dia, medicamentos contendo tanto a proteína integral (*Kogenate*[®], da Bayer; *Helixate*[®], da CSL Behring; *Recombinate*[®] e *Advate*[®], da Baxter), quanto aquela sem o domínio B (*ReFacto*[®] e *Xyntha*[®], da Wyeth/Pfizer) (Rippner *et al.*, 2010).

Atualmente, o Ministério da Saúde é responsável pela importação e distribuição do Fator VIII para cerca de 8.500 hemofílicos do tipo A, com um custo de cerca de 80,5 milhões de dólares (USD) por ano (Amorim Filho, 2010). Com a criação da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), em 2004, o Governo pretende reduzir a necessidade de importação e buscar a auto-suficiência na produção deste fator sanguíneo e de outros medicamentos para uso em hematologia/hemoterapia.

Este ano, iniciou-se a construção da fábrica de hemoderivados da Hemobrás no estado de Pernambuco, com o início da operação previsto para 2014 (MS, 2010). No entanto, a capacidade de processamento de plasma nesta fábrica só será suficiente para atender, no máximo, a 37,5 %⁽²⁾ da demanda brasileira por Fator VIII devido à limitada disponibilidade de matéria-prima (plasma) (CGEE, 2006), além de não solucionar a questão do risco potencial, embora reduzido, de transmissão de patógenos através do plasma de doadores.

2 Este valor, como se verifica nos cálculos apresentados na seção IV.1, está superestimado.

Por outro viés, nota-se que a tecnologia de produção do rFVIII está estabelecida há cerca de vinte anos, de modo que várias das patentes relativas à produção deste biofármaco devem expirar nos próximos anos. Oportunamente, discutem-se, dentro das agências regulatórias de vários países, normas para regulamentar a entrada no mercado dos chamados biossimilares, termo mais utilizado para designar o que seriam os medicamentos baseados em biofármacos já comercializados, cuja patente tenha expirado.

Diante deste cenário, é grande o interesse em se avaliar a viabilidade da implantação de uma planta para produção do Fator VIII recombinante no Brasil. Nos capítulos a seguir, serão revistos os aspectos relativos: ao mercado brasileiro para o Fator VIII recombinante, com o objetivo de se definir a capacidade de produção da planta; aos processos atualmente empregados na produção deste biofármaco, nos quais se baseou o processo ora proposto; às potencialidades e limitações dos simuladores de bioprocessos, para que se possa fazer uma avaliação crítica dos resultados obtidos; e à avaliação econômica, que apontará a viabilidade do projeto e seus pontos críticos.

Ainda, serão detalhados o processo de produção de rFVIII proposto, os modelos utilizados no SPD, a simulação realizada e a respectiva análise econômica. Finalmente, serão discutidos os resultados obtidos.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Análise de mercado

De acordo com Chauvel *et al.* (2003), antes de qualquer análise que se proponha a demonstrar a viabilidade ou inviabilidade técnica ou econômica de um projeto de natureza industrial, deve-se ter em mente o contexto em que este se insere. É preciso reunir uma quantidade de informação sobre as características do local onde a planta industrial será construída e sobre os mercados nos quais as matérias-primas serão encontradas e os produtos, vendidos.

Neste sentido, os autores descrevem três situações determinantes para a definição da capacidade da planta:

- **Matérias-primas e produtos estão facilmente disponíveis no mercado:** nesta primeira situação, a competitividade é obtida através do baixo custo do produto, isto é, o processo deve ser mais eficiente e econômico do que os já existentes.
- **Disponibilidade limitada de matérias-primas e grande mercado para os produtos:** neste caso, o preço do produto deverá ser o preço do mercado, considerado fixo, enquanto que o preço e a qualidade das matérias-primas poderá variar bastante conforme o fornecedor. Assim, a competitividade da planta dependerá de uma diferença mínima entre o preço dos produtos e o custo das matérias-primas, sendo também função do custo de produção e do investimento necessário para uma dada produção.
- **Matérias-primas disponíveis e mercado limitado para os produtos:** nesta situação, as chances de sucesso do empreendimento são limitadas, uma vez que, embora as matérias-primas sejam obtidas a um preço de mercado, fixo, não há oportunidade de venda que justifique a construção de fábricas com grande capacidade. Não há, portanto, o benefício da economia de escala e os preços serão elevados.

No caso específico do Fator VIII recombinante, a segunda situação parece ser a mais realista. De acordo com Avery *et al.* (2003), a demanda por rFVIII excede a oferta e as empresas fabricantes conseguem vender tudo o que produzem. Isto também é afirmado por Garber (2000), que relata uma séria crise de abastecimento deste fármaco devido à maneira rápida com que os hemofílicos passaram a adotar o medicamento recombinante em detrimento do pdFVIII e devido ao crescente uso profilático do Fator VIII para prevenir sangramentos.

Do ponto de vista da disponibilidade da matéria-prima, deve-se ter em conta que os biofármacos mais complexos, tais como o rFVIII, produzidos por tecnologias recombinantes, são caracterizados pelo próprio processo de produção. Isto é, dada a complexidade das moléculas, a determinação apenas das características analíticas e bioquímicas não é considerada suficiente para o lançamento no mercado. O licenciamento é feito para o processo específico, que não pode ser alterado sob pena de haver que licenciar o “novo produto” (Alves *et al.*, 2008). Além disso, uma vez que a qualidade do produto é muito sensível a mínimas variações na qualidade das matérias-primas, o fornecedor não poderá ser facilmente substituído.

No caso do Brasil, a aquisição de Fator VIII é de responsabilidade do Ministério da Saúde, que disponibiliza atualmente cerca de 35.000 UI por paciente hemofílico por ano, tendo sido importados 350 milhões de UI a cerca de USD 0,23, cada, em 2009 (Amorim Filho, 2010). A previsão é de que o processamento do plasma na fábrica da Hemobrás poderia fornecer até 90 milhões de UI por ano de pdFVIII (CGEE, 2006), o que mostra que a demanda brasileira deverá ser suplementada pela importação de pdFVIII ou rFVIII ou produção do rFVIII.

Tendo sido diagnosticados 8.547 pacientes com hemofilia A no Brasil em 2010 (CGSH, 2010), verifica-se que a prevalência atual desta coagulopatia é de 0,90 casos para cada 10.000 homens. Em 2007, a prevalência calculada era de 0,73 casos de hemofilia A para cada 10.000 homens (MS, 2008).

Segundo Pio *et al.* (2009), em diversas populações étnicas e geograficamente distintas já estudadas, a prevalência da hemofilia A é de 1:10.000 nascimentos masculinos. Esta frequência parece não variar consideravelmente entre as populações e tem sido mantida por um equilíbrio entre a perda de mutações, por exemplo, no caso de um paciente com hemofilia que tem somente filhos homens e não transmite aos mesmos a doença, e o aparecimento de mutações espontâneas.

Desta forma, é razoável o cálculo da demanda de rFVIII com base na projeção da população brasileira, tal como procederam Silveira *et al.* (2005), como premissa para o cálculo da capacidade da planta de produção deste biofármaco, conforme será mostrado no item IV.1 do presente trabalho.

II.2. Processos de produção de Fator VIII recombinante

O Fator VIII, assim como outros fatores de coagulação anteriormente obtidos apenas a partir do fracionamento do plasma, tem sido produzido a partir de rotas biotecnológicas como uma solução para a baixa disponibilidade de plasma sanguíneo e para o risco potencial de contaminação viral do plasma de doadores. A Tabela 1 mostra alguns medicamentos disponíveis no mercado, constituídos de fatores de coagulação obtidos a partir da tecnologia do ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante. Além dos listados abaixo, estão sendo desenvolvidos medicamentos contendo outros fatores sanguíneos, tais como Fator de von Willebrand (vWF), Proteína C e Antitrombina III (Bödeker, 2006).

Tabela 1. Fatores de coagulação recombinante licenciados.
(adaptado de Mellado e Castilho, 2008; FDA, 2010)

Proteína recombinante	Marca	Empresa	Registro
Fator VII ativado (rFVIIa)	<i>NovoSeven</i> [®]	Novo-Nordisk	1996
Fator VIII (rFVIII)	<i>Recombinate</i> [®]	Baxter Hyland Immuno	1992
	<i>Kogenate</i> [®]	Bayer HealthCare	1993
	<i>Helixate</i> [®] FS	CSL Behring	2000
	<i>Kogenate</i> [®] FS	Bayer HealthCare	2000
	<i>Advate</i> [®]	Baxter Hyland Immuno	2003
Fator VIII, domínio B deletado (BDD-rFVIII)	<i>ReFacto</i> [®]	Wyeth/Pfizer	1999
	<i>Xyntha</i> [™]	Wyeth/Pfizer	2008
Fator IX (rFIX)	<i>BeneFix</i> [®]	Wyeth/Pfizer	1997

Verifica-se, assim, que a produção de Fator VIII recombinante para terapias de reposição para hemofilia A já está relativamente estabelecida, com alguns medicamentos aprovados para comercialização há mais de quinze anos.

As principais questões que se colocam no desenvolvimento de um processo para produção de proteínas recombinantes em culturas celulares estão relacionadas ao sistema de expressão, isto é, à linhagem celular geneticamente modificada, à composição do meio de cultura, ao sistema de cultivo celular, ao processo de purificação, à inativação viral e à formulação. São nestes aspectos que os produtos acima diferem entre si.

A seguir, serão apresentadas as principais diferenças entre os processos de produção de rFVIII. Note-se que o *Helixate*[®] é produzido sob licença da Bayer, empregando a mesma tecnologia de produção do *Kogenate*[®].

II.2.1. Sistema de expressão

Proteínas complexas, como o Fator VIII, requerem modificações pós-tradução para apresentarem completa atividade biológica, as quais são corretamente realizadas apenas em organismos superiores. Por exemplo, uma destas modificações pós-tradução, a glicosilação, requer uma extensa série de etapas de processamento, realizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Butler, 2008).

Assim, células eucarióticas, que têm capacidade metabólica de realizar este tipo de modificação, são as hospedeiras preferidas para a produção deste tipo de biofármaco. Células de mamíferos, particularmente CHO e BHK, são utilizadas na indústria farmacêutica pelo fato de seus padrões de glicosilação característicos serem similares aos padrões humanos (Butler, 2008).

O Fator VIII é uma das maiores moléculas já clonadas com sucesso. Trata-se de uma proteína com cerca de 290 kDa e altamente glicosilada, conforme representado na Figura 1.

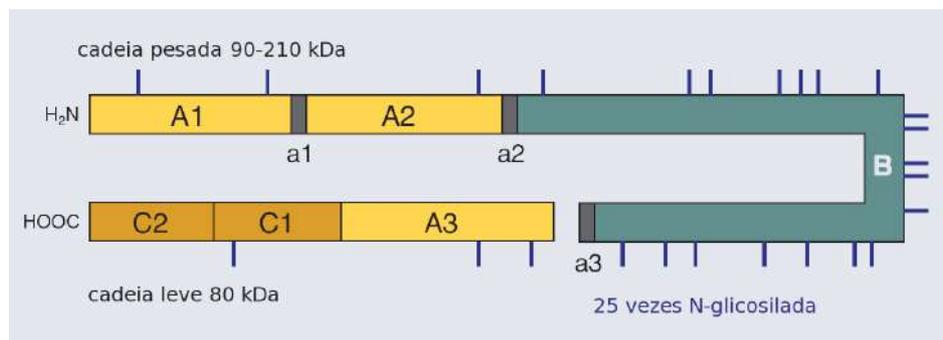


Figura 1. Representação esquemática do Fator VIII humano nativo. (adaptado de Bödeker, 2006)

Para a produção do *Recombinante*[®] e do *Advate*[®], são utilizadas células CHO transfectadas com o gene do Fator VIII humano. As células também possuem o gene do vWF humano, de forma que expressam ambas as proteínas ao mesmo tempo, com o objetivo de estabilizar o rFVIII em meio livre de soro. Segundo Gomperts *et al.* (1992), a escolha das células CHO apresenta como vantagem o fato de ser uma linhagem celular bem caracterizada, com baixa atividade proteolítica e já utilizada para expressar diversas proteínas recombinantes, já havendo bastante experiência a respeito da segurança, meio de cultura e características de crescimento.

O *ReFacto*[®] é produzido a partir de células CHO transfectadas com o gene do Fator VIII humano, mas que não possui o domínio B, o qual, como mencionado anteriormente, não está

presente na forma ativada do Fator VIII. Neste caso, as cadeias de 90 e 80 kDa são diretamente ligadas através de um peptídeo de 14 aminoácidos (Bödeker, 2006).

O *Kogenate*[®] é produzido a partir de células transfectadas com o gene integral do Fator VIII humano. A linhagem utilizada, porém, é a BHK. Além disso, o gene foi amplificado para se obter um grande número de cópias no genoma da hospedeira. Neste caso, a estabilização do rFVIII não é alcançada por meio da coexpressão com o vWF, mas por meio de substâncias orgânicas sintéticas, de baixa massa molar, presentes no meio de cultura (Boedeker, 1992).

Outros sistemas de expressão, particularmente linhagens celulares humanas, têm sido avaliados para a obtenção de fatores de coagulação recombinantes que possuam padrões de glicosilação ainda mais próximos ao humano e, conseqüentemente, menor imunogenicidade (Sandberg *et al.*, 2010).

II.2.2. Composição do meio de cultura

O meio de cultura é um dos fatores mais importantes no cultivo de células animais. Sua função é proporcionar pH e osmolalidade apropriados para a sobrevivência e multiplicação da célula e também fornecer todas as substâncias químicas requeridas pela célula e não sintetizadas por ela. Algumas dessas substâncias podem ser fornecidas por um meio de cultura constituído de substâncias de baixa massa molar, o meio basal. No entanto, a maior parte dos meios basais não consegue proporcionar um bom crescimento, sendo prática comum a suplementação do meio de cultura com aditivos mais complexos e quimicamente indefinidos, como o soro animal (Moraes *et al.*, 2008).

O soro mais comumente utilizado no cultivo de células animais é o de feto bovino. No entanto, o uso de aditivos de origem animal traz um risco potencial para a saúde humana pela possível presença de agentes adventícios, vírus e proteínas como príons no produto final. Neste sentido, houve uma forte recomendação por parte das agências reguladoras, nos últimos anos, de não se utilizar produtos de origem animal na composição dos meios de cultura celular para a produção de biofármacos (Moraes *et al.*, 2008).

Assim, os medicamentos podem ser classificados como sendo de primeira, segunda ou terceira geração conforme os processos de produção vão sendo aperfeiçoados para eliminar o uso de aditivos de origem animal (e mesmo de humanos) do meio de cultura e da formulação. Seguindo esta tendência, o processo do *Xyntha*[™] foi desenvolvido de forma a eliminar completamente tais componentes de origem animal até mesmo das etapas de purificação,

dispensando os anticorpos monoclonais, normalmente utilizados nas colunas de imunoafinidade (Kelley *et al.*, 2010).

No caso do *Recombinate*[®], são utilizados insulina, albumina e aprotinina bovinas como aditivos do meio de cultura, livre de soro. O processo do *Advate*[®], por sua vez, foi aperfeiçoado para utilização de um meio de cultura sem aditivos animais ou humanos. O cultivo celular do *ReFacto*[®] era realizado em meio de cultura livre de soro, suplementado com soroalbumina humana e insulina recombinante. O *Kogenate*[®] é produzido em meio de cultura livre de soro, também suplementado com insulina recombinante e com uma fração de albumina humana (Bödeker, 2006).

II.2.3. Sistema de cultivo celular

Cada ciclo de produção se inicia a partir de uma ampola congelada do banco de células. As células são descongeladas, cultivadas em escalas crescentes e, então, inoculadas em biorreatores de larga escala. Em todos os produtos aprovados, as células animais são cultivadas em suspensão sob condições controladas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e velocidade de agitação. As principais diferenças estão no modo de operação do processo, podendo ser:

- contínuo sem reciclo de células (*Advate*[®]);
- contínuo em perfusão, atingindo-se alta densidade celular (*Kogenate*[®], *ReFacto*[®], *Xyntha*TM);
- semi-contínuo (batelada repetida), com baixa densidade celular (*Recombinate*[®]).

No cultivo contínuo, as células no biorreator são continuamente alimentadas com meio fresco, enquanto que o meio reacional contendo células é retirado à mesma vazão. No cultivo em perfusão, um dispositivo de retenção celular separa as células do meio cultivado recolhido, reciclando-as então para o reator, atingindo-se assim alta densidade celular e possibilitando alta produção em reatores de volumes menores. Outra vantagem do cultivo em perfusão é o controle das condições fisiológicas do meio, mantidas constantes e garantindo a uniformidade da produção (Boedeker, 1992).

Nos cultivos em batelada, as células se multiplicam até que a concentração de produto no meio seja a máxima possível, processando-se o meio cultivado em seguida. Em uma variação conhecida como batelada repetida, após atingida a concentração desejada de produto, apenas parte do meio cultivado é retirada, tipicamente 80-90 %, completando-se com meio fresco

para início de um novo ciclo, o que pode ser repetido várias vezes, caracterizando um cultivo semi-contínuo (Bödeker, 2006).

Este sistema é utilizado no processo de produção do *Recombine*[®], em que a suspensão de células é cultivada em biorreatores de 250 e 2500 L. A cada 3 dias, 88 % do meio reacional é retirado e substituído por meio fresco, conduzindo-se a batelada repetida por um período equivalente a cerca de 60 gerações de células (Gomperts *et al.*, 1992).

Os outros processos são contínuos. O sistema de cultivo do *Advate*[®] é contínuo sem reciclo de células, mantido por várias semanas. Na produção do *Kogenate*[®], o cultivo em perfusão é feito em biorreatores de 50 L, 100 L, 200 L e 500 L, com duração máxima de 185 dias (Bödeker, 1992, 2006).

O processo de produção original do *ReFacto*[®] é dividido em duas fases, com operação em perfusão. Primeiro, há a etapa de crescimento celular em biorreator de 50 L, cuja cultura é utilizada para inocular um biorreator de 500 L. Uma vez atingida a densidade celular desejada, a perfusão é iniciada e a produção do rFVIII é induzida através da adição de butirato e da modificação do pH e da temperatura (Bödeker, 2006).

II.2.4. Purificação

O produto dos biorreatores, livre de células, e separado, por exemplo, por meio de microfiltração, é purificado por uma série de etapas cromatográficas. Contaminantes como DNA e proteínas intracelulares ou do meio são separados da proteína de interesse por meio de diferença entre cargas, massa molar e afinidade. Uma etapa de inativação viral pode estar incluída no processo de purificação (Bödeker, 2006).

O *Recombine*[®] é purificado através de três etapas de cromatografia, a primeira sendo uma de imunoafinidade, em que o rFVIII é adsorvido na resina cromatográfica por anticorpos monoclonais. Seguem-se duas etapas de troca iônica: uma coluna de troca aniônica e outra de troca catiônica (Gomperts *et al.*, 1992). O *Advate*[®] possui um processo de purificação semelhante, com a diferença de que uma etapa de inativação viral com solvente/detergente é incluída entre as duas colunas de troca iônica (Bödeker, 2006).

A purificação do *ReFacto*[®] consiste em cinco etapas cromatográficas e inativação viral com solvente/detergente. A primeira etapa é de troca catiônica com resina *SP-Sepharose*. Seguem-se a inativação viral, uma cromatografia de imunoafinidade, uma cromatografia de troca aniônica com *Q-Sepharose*, cromatografia de interação hidrofóbica usando butil-

Sepharose e, finalmente, uma etapa de exclusão molecular. Conforme mencionado anteriormente, para a produção do *XynthaTM*, na etapa de imunoafinidade substituiu-se o anticorpo monoclonal (mAb) por um ligante peptídico, o qual pode ser quimicamente sintetizado, eliminando-se a necessidade do mAb produzido por culturas de hibridomas murinos (Kelley *et al.*, 2010).

A primeira etapa de purificação do *Kogenate[®]* é uma cromatografia de troca aniônica com dietilaminoetil celulose (DEAE). Em seguida, é conduzida a inativação viral. A próxima etapa é a de imunoafinidade, seguida de afinidade com quelante metálico, em que o cobre imobilizado forma um complexo com o rFVIII. As últimas etapas são de exclusão molecular, troca catiônica e troca aniônica. Nesta última, as impurezas ficam retidas e o rFVIII flui através da coluna (Bödeker, 2006).

II.2.5. Inativação viral

Em geral, o risco de formulações de proteínas recombinantes conterem vírus é muito menor do que o de produtos do fracionamento de plasma, mas, como medida de segurança adicional, vários processos incluem uma etapa de inativação viral.

O tratamento com solvente e detergente, citado acima, destrói a membrana lipídica de vírus envelopados, inativando-os, de modo que eles não possam mais infectar células. Entre as diversas técnicas aplicáveis, esta é comumente adotada por apresentar baixo risco de desnaturar as proteínas presentes no fluido a ser tratado (Silveira *et al.*, 2005).

Além disso, a segurança das proteínas recombinantes é assegurada por medidas de controle em vários níveis (Bödeker, 2006):

- A caracterização das linhagens celulares, tanto no banco de células quanto ao fim de um ciclo de produção típico, é conduzida através de vários testes *in vitro* e *in vivo*, para detecção de contaminantes virais ou microbianos.
- A cada ciclo de produção, o conteúdo dos biorreatores é testado através do cultivo *in vitro* das células utilizadas no processo em conjunto com linhagens indicadoras. Em alguns casos são feitos testes com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA ou RNA viral.
- Matérias-primas de origem biológica são cuidadosamente controladas. Além disso, como observado anteriormente, os processos têm sido aperfeiçoados para utilização exclusiva de matérias-primas sintéticas.

II.2.6. Formulação

Na etapa final do processo de produção do rFVIII, cada excipiente possui uma função específica, com o objetivo de manter a atividade da proteína durante o processamento, armazenamento a longo prazo, reconstituição e administração. Além disso, deve ser levada em conta a segurança do composto, de forma que as formulações de rFVIII aperfeiçoadas eliminaram a albumina de origem animal.

Uma técnica comum para prevenir a perda de atividade da proteína durante o armazenamento a longo prazo é preparar uma formulação sólida seca por meio de liofilização. O objetivo da liofilização é remover água da formulação, já que fenômenos químicos e físicos indesejáveis normalmente ocorrem em fase aquosa (Rippner *et al.*, 2010).

Crioprotetores, tais como sacarose, são necessários para proteger a proteína durante o processo de liofilização e durante o armazenamento, pela formação de uma matriz amorfa ao redor da proteína. Um agente de volume, tal como cloreto de sódio, é utilizado para dar suporte mecânico durante a liofilização. Agentes tamponantes (Tris, histidina) também podem ser adicionados para manter o pH em um valor adequado para a proteína e seu uso terapêutico e a formulação pode conter ainda antioxidantes, tais como glutatona (Rippner *et al.*, 2010).

Como a concentração do rFVIII em soluções terapêuticas é baixa e devido à facilidade com que adsorve a superfícies, geralmente se utiliza um surfactante em concentração acima da concentração micelar crítica nas formulações. Verificou-se, ainda, que íons metálicos, como Ca^{2+} , estão envolvidos na associação entre as cadeias leve e pesada do Fator VIII, de forma que sais de cálcio também estão normalmente presentes nas formulações de rFVIII (Rippner *et al.*, 2010).

A formulação do *Recombinate*[®] contém soroalbumina humana, polietilenoglicol 3350, histidina e cálcio. Já a formulação do *Advate*[®] é completamente sintética e contém trealose (estabilizante), polissorbato 80 (surfactante), histidina, Tris, glutatona e cloretos de sódio e cálcio. O *ReFacto*[®] é formulado com sacarose, polissorbato 80, histidina e cálcio. Finalmente, a formulação do *Kogenate*[®] já conteve albumina, mas atualmente possui sacarose (como indica a sigla FS, formulado com sacarose), glicina, histidina e cloretos de sódio e cálcio (EMEA, 2005; Bödeker, 2006).

II.3. Simuladores de bioprocessos

Simuladores de processos são programas constituídos por uma série de algoritmos computacionais capazes de modelar matematicamente o comportamento de operações unitárias individuais. Cada modelo pode descrever vários fenômenos biológicos, químicos e físicos, podendo também ler informações fornecidas por bancos de dados de propriedades de compostos, materiais e equipamentos (Shanklin *et al.*, 2001).

Estes programas permitem diminuir o tempo requerido para o desenvolvimento do processo, através da comparação de alternativas de processo de maneira consistente, de forma que um grande número de ideias pode ser implementado e analisado interativamente em um período relativamente curto. A simulação de processos de forma integrada permite ainda estudar as interações existentes entre as etapas à montante e à jusante da síntese do produto, também conhecidas como etapas de “*upstream processing*” e “*downstream processing*” (Rouf *et al.*, 2001).

O desenvolvimento industrial de simuladores de processos, tradicionalmente usados na indústria química em geral, particularmente na petroquímica, iniciou-se no final da década de 1950, dentro das próprias empresas que buscavam ferramentas para análise de seus processos. A partir daí, desenvolveram-se modelos bastante completos, isto é, aplicáveis a uma grande variedade de condições de processos, principalmente para destilação, extração e equilíbrio líquido-vapor. No entanto, os simuladores de processos são comparativamente muito pouco desenvolvidos para descrever operações biotecnológicas.

Neste sentido, alguns dos principais desafios que se apresentam ao se utilizar estes *softwares* em bioprocessos são (Shanklin *et al.*, 2001):

- uso de operações unitárias que não são bem caracterizadas e que são fundamentalmente baseadas em fenômenos físicos e biológicos, em vez de princípios de equilíbrio de fases;
- inclusão de matérias-primas e produtos indefinidos, para os quais as propriedades físicas e/ou estruturas não são conhecidas ou cuja composição é desconhecida ou variável;
- integração de etapas em batelada e semi-contínuas, o que pode se mostrar difícil de simular adequadamente;

- necessidade de se levar em conta as operações de *clean-in-place* (CIP) e *steam-in-place* (SIP), incluindo materiais, equipamentos, tempo e mão de obra despendidos, uma vez que são essenciais para atender as exigências das agências regulatórias para os produtos biotecnológicos, especialmente fármacos.

Assim, o desenvolvimento de simuladores comerciais aplicáveis a bioprocessos iniciou-se em meados da década de 1980, quase trinta anos depois do surgimento dos simuladores tradicionais.

Segundo Petrides (2000), o *BioProcess Simulator* (BPS) (desenvolvido pela empresa Aspen Technology, Inc.) foi a primeira ferramenta deste tipo. Para um determinado fluxograma de processo, o *software* efetuava os balanços de massa e energia, estimava o tamanho e custo dos equipamentos e realizava avaliações econômicas. O BPS era limitado por ter sido desenvolvido como uma extensão do *Aspen Plus*, notadamente um simulador para processos que operam em estado estacionário, de forma que processos biotecnológicos operando em batelada não eram satisfatoriamente representados.

O autor também cita outros produtos desta nova categoria, como o *BioPro Designer*, que foi inicialmente desenvolvido no Biotechnology Process Engineering Center (BPEC) do Massachusetts Institute of Technology (MIT). Tendo obtido a licença para esta tecnologia, a empresa Intelligen, Inc. concluiu o *BioPro Designer* e o comercializou para plataforma *Apple Macintosh* primeiro e depois uma versão para o sistema operacional *MS Windows*.

O *SuperPro Designer* (SPD), utilizado no presente trabalho, foi criado como uma extensão do *BioPro Designer*, com objetivo de atender também indústrias relacionadas (por exemplo, fármacos sintéticos, agroquímicos, alimentos etc.) e tratamento de águas e rejeitos. O SPD permite realizar balanços materiais e energéticos, dimensionamento de equipamentos, avaliações econômicas e de impacto ambiental etc., tanto para processos contínuos quanto em batelada.

São citados ainda o *Biotechnology Design Simulator*, ferramenta desenvolvida pela Life Sciences International sobre o sistema *G2* da Gensym, com foco no agendamento de operações em batelada e utilização de recursos como função do tempo; o *BATCHES*, da Batch Process Technologies, simulador de processos em batelada especialmente útil para introduzir um novo processo em uma planta já existente, analisando-se a demanda de recursos como função do tempo; e os simuladores *BatchPlus* e *BDK*, desenvolvidos pelas empresas Aspen

Technology e Hyprotech, respectivamente, ambos direcionados, principalmente, a processos de fármacos sintéticos e química fina.

Do conjunto acima de simuladores mencionados por Petrides (2000), destacam-se o *SuperPro Designer* e seus equivalentes desenvolvido pela Aspen Technology, BPS e *BatchPlus*, respectivamente avaliados por Rouf *et al.* (2001) e Shanklin *et al.* (2001) em trabalhos comparativos com o primeiro.

Shanklin *et al.* (2001) realizaram um estudo para seleção, dentre alguns *softwares*, daquele melhor para a simulação de um processo de produção de uma vacina produzida pela Merck, da escala piloto para a industrial. O objetivo dos autores era determinar a capacidade dos pacotes comerciais em integrar todos os aspectos de um processo biotecnológico industrial, desde a modelagem das operações unitárias até o gerenciamento de equipamentos e previsão de custos, tendo sido selecionados os dois únicos então disponíveis no mercado com tais características.

No estudo dos autores, o SPD mostrou-se um pouco inferior para a aplicação específica, com base em uma análise de decisão que leva em conta o desempenho do simulador em cada quesito avaliado e o peso relativo deste na aplicação desejada. No entanto, comparando-se os resultados em cada quesito, verificou-se que o SPD superava o *BatchPlus* com relação à modelagem das operações unitárias, apresentava uma interface mais intuitiva, e o custo da licença do *software* (para uso industrial) era mais baixo, além de praticamente se equipararem na análise econômica.

O estudo de Rouf *et al.* (2001), por sua vez, utiliza ambos os simuladores, SPD e BPS, para comparar dois fluxogramas de um processo de produção de tPA (ativador do plasminogênio tecidual) em uma cultura de células CHO. Dentre as vantagens do BPS, os autores citam a facilidade em se obter os dados de entrada para a simulação, seja através de bancos de dados, seja através de sub-rotinas para o cálculo das propriedades físico-químicas dos compostos, integrados ao *software*. Por outro lado, o SPD mostrou-se mais adequado para a realização da avaliação econômica.

As limitações dos simuladores aplicáveis a bioprocessos e comercialmente disponíveis também são exploradas por Farid *et al.* (2006), destacando dois caminhos no desenvolvimento de tais ferramentas para bioprocessos: a adaptação dos simuladores tradicionais ou o desenvolvimento de modelos detalhados para operações unitárias particulares, verificados a partir de dados experimentais. Desta forma, sugerem os autores

que nenhum dos *softwares* comercialmente disponíveis para análise e simulação de bioprocessos permite a modelagem do processo como um todo, englobando tanto seu desempenho quanto os outros fatores estratégicos associados, como investimentos, custos de operação, utilização de recursos e incertezas.

Neste sentido, os autores avaliaram e descartaram a utilização do SPD com este objetivo para apresentar um protótipo de simulador, desenvolvido sobre o G2. Na avaliação do SPD, foram destacadas como vantagens a simplicidade para construção do fluxograma de todo o processo e a existência de valores padrão para muitos dos dados de entrada requeridos para a simulação, os quais poderiam ser usados quando os dados experimentais não estivessem disponíveis ou apenas como uma referência.

Como principais desvantagens, os autores destacaram a ausência de ferramentas eficazes para o gerenciamento de recursos (equipamentos, mão de obra etc.), a impossibilidade de incorporar uma distribuição de probabilidades aos valores de certos parâmetros para representação das incertezas e riscos e o fato de oferecer um número limitado de operações, sem a possibilidade de inserir na simulação modelos mais adequados, criados pelo próprio usuário.

Diante deste cenário, não surpreende que o maior distribuidor de *softwares* para simulação na indústria biotecnológica e farmacêutica seja a empresa Microsoft, cujas ferramentas como *Visio*[®] (para construção de fluxogramas), *Excel*[®] (para realização de cálculos e visualização de resultados em gráficos, tipicamente utilizando-se códigos extensos, na forma de macros e sub-rotinas em linguagem *Visual Basic for Applications* - VBA) e *Project*[®] (para gerenciamento de recursos) são amplamente utilizadas devido ao baixo custo e familiaridade dos usuários (Gosling, 2003; Toumi *et al.*, 2010).

O SPD foi selecionado para uso no presente trabalho, pois se mostra como uma ferramenta bastante adequada para realizar uma avaliação preliminar de alternativas e revelar os pontos economicamente mais sensíveis de um bioprocessos complexo. Os resultados deste tipo de estudo podem ser usados no planejamento e alocação de recursos de P&D e na geração de orçamentos de projeto.

II.4. Avaliação econômica de processos

Como observado por Mazin e de Andréa (2010), a viabilidade técnica de um determinado processo produtivo é condição necessária mas não suficiente para a implantação do mesmo. Ao domínio das técnicas produtivas, deve estar aliada uma série de condições materiais, sociais e econômicas. Assim, avaliar economicamente um processo consiste em estimar o investimento e os custos operacionais envolvidos, estimar a renda passível de ser obtida com a venda do(s) produto(s) e, finalmente, avaliar os indicadores de atratividade de investimento, baseando-se no fluxo de caixa previsto para o empreendimento.

Este procedimento pode ser feito com diferentes propósitos, em diferentes estágios do desenvolvimento do empreendimento. A avaliação econômica de um processo, assim como o projeto do processo, requer a integração do conhecimento de muitas disciplinas diferentes e é conduzida em vários níveis de detalhamento.

Quanto maior o detalhamento, maior a precisão e também o custo do projeto e de sua avaliação econômica. Petrides (2000) apresenta uma classificação para tais níveis de detalhamento, associando-os ao grau de exatidão da estimativa e ao custo típico associado ao projeto de uma planta de 50 milhões de dólares, conforme sintetizado na Tabela 2⁽³⁾.

Tabela 2. Níveis de estimativas de projetos.
(adaptado de Petrides, 2000)

Nível	Tipo de estimativa	Incerteza	Custo (USD 1.000,00)
1	Ordem de grandeza (estimativa de proporção), baseado em dados de custos similares anteriores.	≤ 50 %	-
2	Planejamento de projeto (estimativa de orçamento), baseado no conhecimento dos principais equipamentos.	≤ 30 %	20-40
3	Engenharia preliminar (estimativa de escopo), baseado em dados suficientes para permitir que a estimativa resulte em um orçamento.	≤ 25 %	50-100
4	Engenharia detalhada (etapa de aprovação de capital), baseado em dados quase completos do processo.	≤ 15 %	100-200
5	Aquisição e construção (estimativa do empreiteiro), baseado em desenhos técnicos, especificações e pesquisa de campo completos.	≤ 10 %	3,000-7,000

Estimativas de ordem de grandeza são normalmente feitas por engenheiros experientes que trabalharam em projetos similares, levando minutos ou horas para serem concluídas, mas

³ Estes valores podem ser até 10 vezes superiores no caso de uma planta para produção de biofármacos (Amorim Filho, 2010).

com um erro associado de até 50 %. Estudos realizados em estimativas dos níveis 2 e 3 normalmente levam alguns dias ou semanas para serem concluídos, utilizando ferramentas computacionais apropriadas.

O principal objetivo destes estudos é avaliar alternativas e apontar as áreas mais sensíveis economicamente, considerando a complexidade do processo. Os resultados destas análises são utilizados para o planejamento de pesquisa e desenvolvimento futuros e para gerar orçamentos para o projeto.

Finalmente, estudos dos níveis 4 e 5 são usualmente conduzidos por empresas de engenharia e construção, contratadas para construir novas plantas industriais para produtos promissores e em estágio avançado de desenvolvimento (Petrides, 2000).

Para se chegar a um orçamento para o projeto, é necessário estimar custos de diversas naturezas. Isto pode se tornar uma tarefa bastante complexa, dada a indisponibilidade de dados exatos para muitas das fontes de custo do processo. Assim, a metodologia de uma avaliação econômica exige uma classificação e agrupamento preliminar destas fontes. Dessa forma, pode-se apreciar a relação entre elas e a estimativa de custos é facilitada pela aplicação de fatores, isto é, constantes que relacionam custos de duas ou mais fontes diferentes.

A referida classificação, aplicada especificamente aos projetos da indústria química, pode ser encontrada em obras de autores como Douglas (1988), Peters *et al.* (2004) e Chauvel *et al.* (2003). Tradicionalmente, e de maneira lógica, há uma primeira divisão dos custos avaliados entre investimentos e custos operacionais.

O investimento é o montante dos recursos necessários para implantar um projeto até torná-lo em condições de operação comercial. Esse montante é calculado pelo somatório dos custos de investimento fixo, capital de giro e custos de partida da planta. Desta soma, o investimento fixo é a parcela mais importante e, por sua vez, pode ser estimado através de um método baseado no valor dos equipamentos principais, pois estes representam a maior parcela de um investimento na indústria química (Ferreira *et al.*, 1995).

Os custos operacionais são os que se materializam após o início da operação comercial e englobam custos variáveis, custos fixos e mão de obra. Os custos variáveis são proporcionais ao nível de produção, não à capacidade instalada da planta, estando relacionados às matérias primas, utilidades, tratamento de rejeitos. Os custos fixos são proporcionais à capacidade

instalada da planta e independem da produção, tais como custos de manutenção, seguro das instalações, custos administrativos, depreciação dos equipamentos. A mão de obra inclui os custos de mão de obra de operação, bem como cargos de supervisão, chefia e de laboratório, sendo considerado não-variável, por não estar diretamente ligada ao nível produtivo (Mazin e de Andréa, 2010).

O detalhamento dos investimentos e custos operacionais varia conforme o método utilizado e as especificidades do projeto, assim como de acordo com os fatores que relacionam as fontes de custo. No presente projeto, no entanto, a utilização do SPD como ferramenta de projeto e análise econômica determinou a adoção da metodologia implementada no *software*, como descrito no manual do mesmo (Intelligen, 2005)⁽⁴⁾.

Na estrutura do **Relatório de Avaliação Econômica** (*Economic Evaluation Report - EER*) do SPD, os investimentos estão desagrupados, sendo apenas o investimento fixo avaliado em um primeira seção. O investimento fixo (*capital cost*) inclui:

- **Custo de aquisição dos equipamentos:** relaciona o custo do equipamento, tal como informado pelo fabricante, excluindo impostos, seguro, frete e instalação.
- **Instalação:** refere-se a instalação do equipamento no local, incluindo fundações, suportes e equipamentos auxiliares; cada unidade possui um fator específico para estimativa deste custo.

Os subitens a seguir são estimados a partir do custo total de aquisição dos equipamentos, multiplicados por um fator associado a cada um deles:

- **Tubulações:** inclui todas as tubulações que interconectam os equipamentos, incluindo conexões para utilidades e ventilação, válvulas, suportes e isolamento relacionados às tubulações.
- **Instrumentação:** inclui transmissores e controladores e todo o material necessário para a instalação deles, painéis de controle, alarmes, computadores e unidades de processamento locais.
- **Isolamento:** o custo com isolantes e pintura está incluído nas estimativas de instalação e tubulações; no entanto, em caso de plantas que operam a baixas

4 Aqui se faz referência ao manual fornecido com a versão do *software* utilizada no presente trabalho, 6.0. O manual completo da versão mais recente, 8.0, pode ser obtido em <<http://www.intelligen.com/demo.shtml>>.

temperaturas, recomenda-se incluir um custo adicional exclusivamente para isolamento térmico.

- **Eletricidade:** refere-se ao custo com subestações e linhas de transmissão locais, iluminação, suprimento emergencial de energia etc.
- **Edificações:** inclui torres, lajes, escadas e passarelas (não relacionadas a equipamentos específicos), sala de controle, escritórios, depósitos e, ainda, utilidades não-elétricas e itens de segurança relacionados às edificações.
- **Terreno:** inclui escavação, terraplanagem e também estradas, estacionamentos, hidrantes, entre outros custos.
- **Instalações auxiliares:** refere-se às instalações diretamente relacionadas ao processo e essenciais ao funcionamento da planta, mas não incluídas entre os equipamentos principais, tais como caldeira de vapor etc.

A soma dos custos acima constitui o **Custo Direto Total da Planta** (*Total Plant Direct Cost* - TPDC), o qual é utilizado nas estimativas dos custos de **Engenharia e Construção**, que constituem o **Custo Indireto Total da Planta** (*Total Plant Indirect Cost* - TPIC) e são obtidos pela multiplicação do TPDC por um fator.

Custos de Engenharia referem-se ao preparo de documentação de todo o processo: projetos de equipamentos, folhas de especificação para equipamentos, instrumentação etc.; projeto da lógica de controle e *softwares*, desenhos e outros. Os custos de Construção são aqueles associados ao esforço total de construção, não incluídos o custo de mão de obra.

O **Custo Total da Planta** (*Total Plant Cost* - TPC) é simplesmente a soma do TPDC com o TPIC e não inclui a remuneração do **Empreiteiro** e verba de **Contingência** (relativa aos eventos adversos inesperados), obtidos pela multiplicação do TPC por seus respectivos fatores.

Os custos operacionais, por sua vez, são subdivididos como segue, os custos variáveis sendo calculados a partir dos resultados da simulação e custos unitários especificados e os custos fixos, a partir de como estão relacionados aos custos variáveis ou à mão de obra:

- **Matérias-primas:** refere-se ao custo de todas as matérias-primas puras e misturas, cuja quantidade é calculada na simulação e cujo preço unitário é o padrão do banco de dados do SPD ou é especificado pelo usuário no registro de componentes.

- **Utilidades:** inclui custos com aquecimento, resfriamento e agitação mecânica, podendo estar ou não associados a uma determinada operação (como uma reação com temperatura controlada).
- **Consumíveis:** inclui o custo de reposição periódica de membranas, resinas cromatográficas etc.
- **Tratamento de rejeitos:** depende da natureza do rejeito e é especificado pelo usuário para cada corrente de rejeitos ou calculado pelo SPD a partir da composição.
- **Mão de obra:** é estimado com base no total de horas calculadas para cada tipo de operário, os quais são definidos nos parâmetros de mão de obra de cada operação do processo.
- **Laboratório:** atividades de análise e controle de qualidade são incluídas neste subitem; por padrão, este custo é estimado multiplicando-se o custo de mão de obra por um fator, mas o usuário pode especificar valores para cada atividade.
- **Custos fixos (*Facility-dependent*):** estão agrupados nesta categoria, custos administrativos, seguros, impostos locais, manutenção, custos financeiros e provisão para depreciação, calculados de acordo com modelos e fatores multiplicativos específicos; alternativamente, o usuário pode associar estes custos ao tempo de uso ou à disponibilidade dos equipamentos.

Finalmente, há custos adicionais que são considerados zero como padrão, mas que podem ser alterados pelo usuário para levar em conta custos excepcionais, tais como:

- **Transporte:** custos de transporte em longas distâncias, por quaisquer meios disponíveis, diretamente associados à produção.
- **Royalties:** relacionados ao pagamento de licença para uso de patentes de terceiros e outros custos relacionados a propriedade intelectual.
- **Propaganda e comercialização:** custos associados ao departamento de vendas.
- **Descarte de produto:** relativo ao descarte ou reciclo de produtos inadequados à comercialização.
- **Variados:** associados a pesquisa e desenvolvimento (P&D), validação do processo etc.

A última seção do EER fornece dados adicionais sobre os investimentos, sobre as receitas e alguns indicadores de rentabilidade:

- **Capital de giro:** representa o investimento em materiais temporários ou consumíveis, necessários para a condução do negócio, podendo ser determinado pelo usuário ou calculado a partir de contribuições da mão de obra, matérias-primas, utilidades, tratamento de rejeitos e custos variados.
- **Custos de partida da planta e validação do processo:** podem ser determinados pelo usuário ou calculados como uma porcentagem do investimento fixo.
- **Margem bruta:** é definida como a razão entre o lucro bruto (renda total subtraída dos custos operacionais) e a renda total.
- **Retorno sobre investimento:** é definido como a razão entre o lucro líquido e o capital investido.
- **Tempo de retorno:** é definido como a razão entre o capital investido e o lucro líquido, determinando aproximadamente o tempo, em anos, necessário para que o lucro acumulado se iguale ao investimento inicial.

Embora os três indicadores de rentabilidade acima sejam muito utilizados e úteis para determinar a viabilidade econômica de um processo, eles são considerados por muitos autores como critérios imediatistas e não-confiáveis, apresentando limitações por não considerarem possíveis variações das receitas e dos custos ao longo da vida útil do projeto e não considerarem a variação do valor do dinheiro com o tempo (Ferreira *et al.*, 1995).

Assim, uma análise econômica mais rigorosa deve levar em conta a análise do fluxo de caixa e os indicadores associados, como definidos a seguir:

- **Valor Presente Líquido (VPL):** é calculado pelo SPD para três taxas mínimas de atratividade (TMA) diferentes, definidas pelo usuário, através da Equação 1

$$VPL = \sum_{t=1}^n \frac{FC_t}{(1+j)^t} \quad (1)$$

onde j é a taxa de juros de uma aplicação monetária alternativa ao investimento no empreendimento, FC_t é o fluxo de caixa líquido no ano t e n é a vida útil do projeto (em número de anos).

- **Taxa Interna de Retorno (TIR):** é calculada com base nos fluxos de caixa antes e depois dos impostos, de maneira similar ao VPL, mas, neste caso, em vez de se obter um VPL para determinada taxa de juros, calcula-se a taxa de juros que tornaria zero o valor presente do fluxo de caixa.

Portanto, para a análise econômica do processo de produção de rFVIII aqui apresentado, estes indicadores foram adotados, conforme será discutido mais detalhadamente nos capítulos III e IV.

III. METODOLOGIA DE SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FATOR VIII RECOMBINANTE

III.1. Descrição do processo proposto

O processo de produção de Fator VIII recombinante proposto Silveira *et al.* (2005) foi idealizado a partir dos processos de produção dos fármacos então comercializados no mundo (*Kogenate*[®], *Recombinate*[®], *ReFacto*[®] e *Kogenate*[®]*FS*), além do pedido de patente depositado por Kelley *et al.* (2004), para as etapas de purificação do processo.

O processo proposto possui a seguinte sequência de etapas:

1. propagação do inóculo;
2. cultivo em perfusão;
3. microfiltração;
4. cromatografia de troca catiônica;
5. inativação viral;
6. diafiltração;
7. cromatografia de imunoafinidade;
8. cromatografia de troca aniônica;
9. formulação;
10. microfiltração (esterilização); e
11. liofilização.

Foi proposta, ainda, a instalação de tanques de equalização providos de sistema de agitação para estocagem de fluido de processo entre as etapas 2 e 3; 3 e 4; 6 e 7; 7 e 8.

No presente trabalho, foram mantidas as principais etapas do processo, as quais serão discutidas a seguir, tendo sido efetuadas algumas alterações que resultaram no fluxograma ilustrado na Figura 2.

III.1.1. Propagação do inóculo

Na etapa de propagação de inóculo, as células do criotubo são propagadas em três frascos agitados consecutivos. O dimensionamento dos equipamentos de propagação foi feito com base nos dados de concentração celular típicos para os processos de cultivo em batelada, conforme Silveira *et al.* (2005), e no volume estimado para o biorreator operando em perfusão, cujo cálculo detalhado está apresentado no capítulo IV.

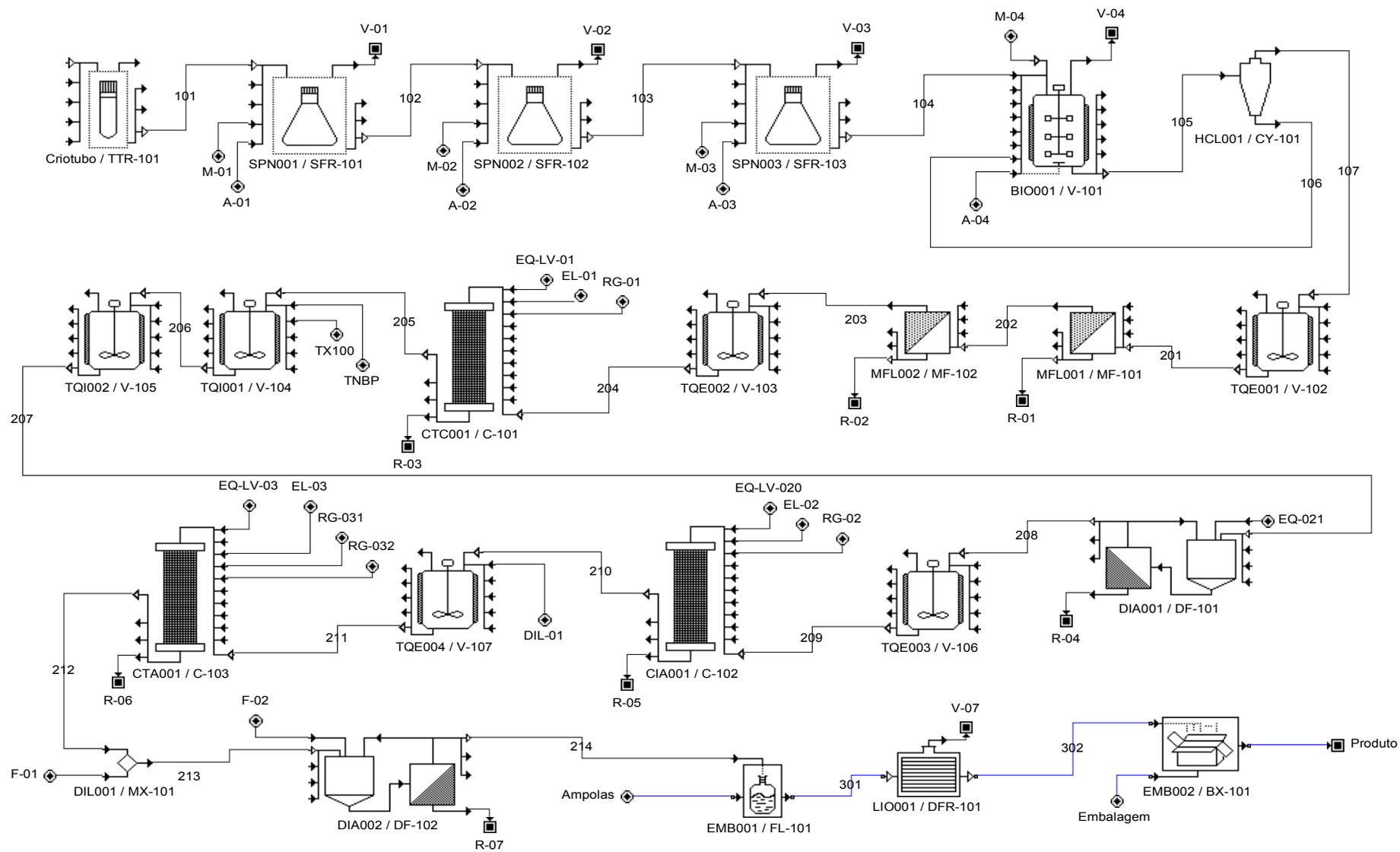


Figura 2. Fluxograma do processo

A concentração celular usual no início de um cultivo em batelada é de $2,0 \times 10^5$ células mL⁻¹. Para alcançar esta concentração no biorreator em perfusão, cujo volume útil calculado é de 52 L, é necessário que o volume do biorreator de inóculo imediatamente anterior seja dimensionado em conformidade com a concentração usual ao fim de um cultivo em batelada, $1,0 \times 10^6$ células mL⁻¹. Esta razão entre concentração celular inicial e final é considerada constante em todas as etapas de propagação do inóculo e assim, aplicando-se sucessivamente a equação de diluição, a razão entre os volumes dos equipamentos de propagação também será sempre de 5:1.

III.1.2. Cultivo em perfusão

O cultivo em perfusão é realizado em um biorreator munido de um sistema de agitação e de borbulhamento de ar em profundidade (Silveira *et al.*, 2005). No presente projeto, o dimensionamento do biorreator foi calculado com base na produção anual estimada, no rendimento global obtido na purificação do produto, na taxa específica de formação do produto de interesse, o rFVIII ($1 \text{ pg célula}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e no número de ciclos de purificação por ano (290, no total, com duas campanhas de cultivo com duração aproximada de 145 dias cada).

A retenção de células é realizada por um hidrociclone conectado externamente ao biorreator. Um primeiro tanque de equalização recolhe o fluido de processo do *overflow* dos hidrociclones e o estoca para alimentar a unidade de microfiltração com a vazão adequada, conforme descrito em Silveira *et al.* (2005). Dada a diferença entre as vazões de saída de perfundido e de operação da unidade de microfiltração, estimou-se que o primeiro tanque de equalização teria 700 L, para que fosse capaz de estocar o fluido de processo proveniente de um dia de operação do biorreator, a uma taxa de perfusão de 10 vvd (volume de meio por volume útil de reator por dia), conforme descrito em Avery *et al.* (2003).

Cabe acrescentar que todos os tanques e reatores são construídos em aço inoxidável 316, de acordo com as práticas vigentes para a indústria biofarmacêutica, conhecidas como *current Good Manufacturing Practices* (cGMP) e adotadas pelas principais agências regulatórias governamentais.

III.1.3. Microfiltração

A unidade de microfiltração tem por objetivo separar debris celulares, células e outras partículas remanescentes, contidos no perfundido. Esta unidade é constituída de dois módulos operando em série. O primeiro módulo possui uma altura interna de 12 " e é provido

de um cartucho de membranas com área de filtração disponível de 1,8 m², tamanho de poro de 1 µm e pressão de operação de 1 bar a 20 °C, devendo ser trocado a cada ciclo de operação. O segundo módulo possui uma altura de 30 " e é provido de um cartucho de membranas combinadas de tamanhos de poro iguais a 0,45 e 0,22 µm, também com área de filtração disponível de 1,8 m², operando a 4 bar e 20 °C, devendo ser trocado a cada 4 ciclos de operação. O rendimento típico desta etapa, incluindo ambos os módulos, é de 95 %. O tempo de filtração foi calculado com base no fluxo de filtrado de 85 L m⁻² h⁻¹ (Silveira *et al.*, 2005).

O segundo tanque de equalização é disposto antes da coluna de troca catiônica, armazenando o fluido de processo enquanto a coluna está processando as etapas de equilíbrio, lavagem, eluição, regeneração, limpeza, sanitização e manutenção. O volume estimado para o segundo tanque de equalização é de 350 L, metade do volume do primeiro tanque de equalização.

III.1.4. Cromatografia de troca catiônica

A coluna de troca catiônica localiza-se após o segundo tanque de equalização e tem por objetivo eliminar a maior parte dos contaminantes. A coluna escolhida possui um diâmetro de 30 cm conforme descrito em Silveira *et al.* (2005). A altura, no entanto, foi calculada com base na massa de proteínas adsorvidas, que foi estimada como 100 % da proteína de interesse mais cerca de um terço das outras proteínas presentes, a maior parte das quais é eliminada nesta etapa.

Dados adicionais da operação da coluna são encontrados no trabalho de Silveira *et al.* (2005): a velocidade superficial recomendada (400 cm h⁻¹); o rendimento típico, isto é, a quantidade do produto de interesse recuperada (80 %); e a resina utilizada (*SP Sepharose Fast Flow*, da empresa GE Healthcare, cuja capacidade adsortiva é de 20 g L⁻¹, e que deve ser trocada a cada 150 ciclos).

A operação das colunas cromatográficas envolve diversas etapas, como detalhado a seguir:

- **Equilíbrio:** Tem por objetivo ajustar o pH e/ou a condutividade do leito de resina empacotada na coluna. Utiliza-se um tapão que maximize a adsorção da proteína de interesse. A coluna é considerada em equilíbrio quando os valores de pH e condutividade não mais se alteram.
- **Aplicação de amostra:** Deve ser realizada com uma velocidade superficial apropriada com o objetivo de maximizar o rendimento e minimizar o tempo de operação.

- **Lavagem:** Utiliza-se, nesta etapa, em geral o mesmo tampão da etapa de equilíbrio ou um tampão com força iônica um pouco maior que o tampão de equilíbrio, para que as proteínas fracamente adsorvidas, contaminantes, sejam removidas já nesta etapa.
- **Eluição:** A etapa de eluição é realizada com uma solução de pH ou força iônica determinada previamente, capaz de dessorver a proteína de interesse (ou as impurezas retidas, caso se tratasse de uma cromatografia negativa).
- **Regeneração:** A regeneração é realizada com uma solução de alta força iônica e tem o objetivo de eluir as substâncias que, porventura, continuem retidas na resina, bem como restituir os contra-íons originais da resina. Algumas proteínas desnaturadas ou lipídeos podem ainda permanecer retidos nesta etapa, daí a necessidade da etapa de limpeza (CIP).
- **CIP (*cleaning-in-place*):** Tem o objetivo de remover substâncias que possam ter ficado retidas.
- **Sanitização:** Realizada, geralmente, com NaOH, esta etapa tem como objetivo evitar uma possível contaminação microbiana.
- **Manutenção:** A resina é mantida em um tampão apropriado ao final do ciclo para sua conservação.

Os dados das etapas específicas da coluna de troca catiônica estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados das etapas da operação da coluna de troca catiônica. (adaptado de Silveira *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2004; Amable, 2008)

Etapa	Volume aplicado (volumes de coluna)	Solução empregada
Equilíbrio	5	histidina 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8 (Tampão A)
Lavagem	5	Tampão A
Eluição	5	NaCl 0,8 M, EDTA 3 mM, surfactante Octoxynol 90,02 % (v/v), NH ₄ Ac 0,1 M, CaCl ₂ 5 mM, sorbitol 1 M, pH 6,3 (Tampão B)
Regeneração	3	NaCl 2 M
Sanitização	3	NaOH 0,5 M
Manutenção	2	NaOH 0,01 M (até o ciclo seguinte)
CIP 1ª etapa	32	NaOH 0,5 M (por 2 h)
2ª etapa	2	NaOH 0,01 M

III.1.5. Inativação viral

A inativação viral sucede a cromatografia de troca catiônica, com o objetivo de romper a membrana lipídica de vírus envelopados, inativando-os. A operação é constituída de duas etapas, realizadas em dois tanques consecutivos.

Na primeira etapa, à solução eluída contendo rFVIII são adicionados tri(*n*-butil)fosfato (TNBP) e Triton X-100 em quantidades suficientes para se atingir as concentrações de 0,3 % e 1,0 % (v/v), respectivamente. O tanque é provido de sistema de agitação e a temperatura é mantida a 24 °C, por uma hora. A etapa seguinte consiste simplesmente em verter a mistura em um segundo tanque de mesmo volume para garantir a homogeneidade, de modo que todo o conteúdo do primeiro tanque entre em contato com o solvente e detergente. A mistura permanece sob agitação, também a 24 °C, por 5 horas. O rendimento de rFVIII na inativação viral é de 85 % (Silveira *et al.*, 2005).

III.1.6. Diafiltração

Os solventes utilizados na etapa anterior são substituídos pelo tampão de equilíbrio da etapa cromatográfica seguinte em um módulo de diafiltração, o qual opera a uma vazão de 25 L h⁻¹. Considera-se que o rendimento de rFVIII nesta etapa é de 95 %. O módulo possui uma área total de filtração de 0,1 m² e opera a uma pressão de alimentação máxima de 4 bar.

O volume de solução trocada é de 4,5 vezes o volume alimentado, removendo-se cerca de 99 % do TNBP e Triton X-100. O cartucho deve ser substituído a cada 4 ciclos de operação. Há, ainda, uma operação de limpeza e desinfecção do módulo, realizada com uma solução de NaOH 0,1 M, a 40 °C e com duração de 30 minutos (Silveira *et al.*, 2005).

Um terceiro tanque de equalização estoca o fluido de processo para a etapa de cromatografia de imunoafinidade subsequente. O volume estimado para este tanque é 100 L.

III.1.7. Cromatografia de imunoafinidade

A cromatografia de imunoafinidade adsorve apenas o rFVIII, sendo, portanto, bastante específica e eliminando a quase totalidade dos contaminantes ainda presentes. De acordo com Silveira *et al.* (2005), esta etapa possui um rendimento, de rFVIII de 90 %.

A resina utilizada é a *CNBr-activated Sepharose 4 FF*, com MAb anti-FVIII imobilizado, sendo substituída a cada 25 ciclos e cuja capacidade adsortiva é de 2 g L⁻¹. A concentração de ligante na resina é calculada em 3,3 g L⁻¹. A velocidade superficial recomendada é de

200 cm h⁻¹. Dados adicionais, relativos a cada etapa da operação da coluna de imunoafinidade, estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Dados das etapas da operação da coluna de imunoafinidade. (adaptado de Silveira *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2004; Smeds, 1999)

Etapa	Volume aplicado (volumes de coluna)	Solução empregada
Equilíbrio	5	imidazol 25 mM, NaCl 1 M, CaCl ₂ 5 mM, pH 6,8 (Tampão C)
Lavagem	5	Tampão C
Eluição	3	histidina 0,05 M, CaCl ₂ 0,05 M, etilenoglicol 50 % e Octoxynol 9 (ou <i>Tween</i>) 0,02 %, pH 6,6 (Tampão D)
Regeneração	3	2 M NaCl
Sanitização	3	NaOH 0,1 M
Manutenção	2	NaOH 0,01 M (até o ciclo seguinte)
CIP	1ª etapa	NaOH 0,1 M (por 2h)
	2ª etapa	NaOH 0,01 M

Por sua especificidade, o volume de resina necessário é muito menor que o utilizado na coluna de troca catiônica. Assim a coluna escolhida no presente projeto possui um diâmetro de 14 cm, o mesmo da coluna de troca aniônica, subsequente a esta etapa, e a altura do leito é calculada com base na massa de rFVIII adsorvida.

O quarto e último tanque de equalização localiza-se após a coluna de cromatografia de imunoafinidade, estocando o volume de solução eluída e diluindo-a em três vezes para maximizar o rendimento da etapa seguinte, uma cromatografia de troca aniônica, conforme recomendado por Kelley *et al.* (2004). A diluição é feita com uma solução similar ao Tampão D, mas sem etilenoglicol e com NaCl 22,5 mM, para que, após a diluição, as concentrações se igualem àquelas do tampão de equilíbrio da etapa seguinte. O volume calculado para este tanque é de 5 L.

III.1.8. Cromatografia de troca aniônica

Segundo Silveira *et al.* (2005), a cromatografia de troca aniônica apresenta um rendimento em termos de rFVIII de 90 %. Nesta etapa utiliza-se a resina *Q Sepharose Fast Flow*, a qual deve ser substituída a cada 150 ciclos e cuja capacidade adsortiva é de 20 g L⁻¹. A velocidade superficial recomendada é de 400 cm h⁻¹. Os detalhes de cada etapa de operação são apresentados na Tabela 5.

Uma ressalva deve ser feita nesta terceira e última etapa cromatográfica: embora Silveira *et al.* (2005) tenham afirmado que o rFVIII adsorve na resina e não se tenha encontrado informação contrária em algumas das patentes que descrevem a tecnologia (Arrighi *et al.*, 1993; Chan e Harris, 2001), havia dúvidas se esta não seria uma cromatografia negativa, isto é, com as impurezas adsorvidas na resina, conforme sugerido em Bhattacharyya *et al.* (2003).

Tendo em vista a função desta última etapa cromatográfica, isto é, eliminar partículas de anticorpos monoclonais que possam ter se desprendido da coluna de imunoafinidade, optou-se pela cromatografia negativa e o volume de resina utilizado nesta coluna foi considerado como o mesmo da coluna anterior.

Tabela 5. Dados das etapas da operação da coluna de troca aniônica. (adaptado de Silveira *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2004)

Etapa	Volume aplicado (volumes de coluna)	Solução empregada
Equilíbrio	5	histidina 0,05 M, CaCl ₂ 0,05 M, Octoxynol 9 (ou Tween) 0,02 %, NaCl 15 mM, etilenoglicol 17 %, pH 6,6 (Tampão E)
Lavagem	5	Tampão E
Eluição	3	histidina 0,05 M, CaCl ₂ 4 mM, NaCl 0,4 M, pH 6,3 (Tampão F)
Regeneração	1ª etapa	NaCl 2 M, fosfato de sódio monobásico 0,1 M, pH 3 (Tampão G)
	2ª etapa	NaCl 2 M, fosfato de sódio dibásico 0,1 M, pH 11 (Tampão H)
Sanitização	3	NaOH 0,5 M
Manutenção	2	NaOH 0,01 M (até o ciclo seguinte)
CIP	1ª etapa	NaOH 0,5 M (por 2h)
	2ª etapa	NaOH 0,01 M

III.1.9. Formulação

As etapas finais propostas no presente trabalho diferem um pouco do processo proposto por Silveira *et al.* (2005). Em substituição ao tanque de formulação seguido do módulo de microfiltração, que esteriliza o produto antes da liofilização, inseriu-se no presente projeto uma segunda unidade de diafiltração.

A segunda diafiltração promove a substituição da solução de eluição da coluna de troca aniônica pela solução que contém os componentes da formulação final do produto. A operação deste segundo módulo de diafiltração é similar à do anterior (rendimento de 95 %,

área total de filtração de 0,1 m², pressão de alimentação máxima de 4 bar e volume de solução trocada de 4,5 vezes o volume alimentado).

A formulação do concentrado de rFVIII na apresentação de 500 UI é detalhada na Tabela 6. O pó deve ser reconstituído com 2,5 mL de água para injeção, de modo que a composição da solução reconstituída será (em frações mássicas): 1,08 % de sacarose, 0,30 % de histidina, 2,23 % de glicina, 0,17 % de NaCl, 0,03 % de CaCl₂ e 96,19 % de água para injeção. Observe-se que, dada a alta atividade específica do fator VIII recombinante (até 10.000 UI mg⁻¹), em termos mássicos, sua concentração na solução é inferior a 0,003 %.

Tabela 6. Formulação do *Kogenate*[®]*FS*.
(adaptado de EMEA, 2005)

Componente	Quantidade por ampola
rFVIII	500 UI
Sacarose	28,0 mg
Histidina	8,0 mg
Glicina	58,0 mg
Cloreto de Sódio	4,4 mg
Cloreto de Cálcio	0,7 mg

O cálculo da composição da solução de formulação deve levar em conta a composição do tampão de eluição da coluna de troca aniônica, qual seja, 0,78 % de histidina, 0,04 % de CaCl₂, 2,34 % de NaCl e 96,84 % de água (em frações mássicas).

III.1.10. Liofilização

A formulação é liofilizada dentro das próprias ampolas oferecidas ao consumidor final. Portanto, há em seguida uma etapa de distribuição da solução, que é representada em um modelo específico do SPD.

As ampolas contendo a solução são transferidas para o liofilizador, que irá submetê-las a uma temperatura inferior a -20 °C e alto vácuo, fazendo com que a água se transforme em gelo e sublime.

De acordo com a descrição do *Kogenate*[®]*FS*, em sua apresentação final, o medicamento é um pó estéril, liofilizado, apresentado em ampolas de vidro de 10 mL, com tampa de borracha bromobutílica. O solvente para reconstituição, fornecido com um volume extra de 0,6 mL além dos 2,5 mL necessários, para compensar perdas na transferência, é apresentado em ampolas de vidro de 10 mL com tampa de borracha clorobutílica (EMEA, 2005).

Assim, após a liofilização segue-se a etapa de embalagem, também representada por um modelo específico do SPD, finalizando o processo.

III.2. Modelagem das etapas do processo

Para melhor compreensão de como se procedeu a simulação, bem como das opções disponibilizadas pelo simulador ao usuário e, destas, as empregadas no presente trabalho, serão discutidos brevemente os modelos utilizados na versão 6.0 (edição *Academic Site*) do SPD (Intelligen, 2005).

III.2.1. Biorreatores

O SPD possui dois tipos de modelos reacionais para operações etapas de cultivo celular, denominadas genericamente no *software* de fermentação: fermentação estequiométrica e cinética.

O modelo estequiométrico é mais simples e pode ser usado quando a cinética da reação é desconhecida e o grau de avanço da reação pode ser especificado ou calculado a partir da concentração de um componente de referência. O grau de avanço é definido como uma porcentagem da conversão do componente limitante.

Refere-se aqui a componentes como elementos da reação, uma vez que os modelos utilizados podem não envolver apenas substâncias puras. Misturas complexas representadas pela biomassa, pelo meio de cultivo ou por misturas de proteínas contaminantes, entre outras, podem estar envolvidas em um modelo reacional.

É possível inserir mais de uma reação, considerando-se que as mesmas ocorrem sequencialmente. O usuário deve informar os coeficientes estequiométricos de cada componente, em base molar ou mássica. Também deve ser informado o grau de avanço da reação, com base no componente limitante ou em um componente de referência informado pelo usuário.

O SPD calcula assim um balanço de massa simples, de acordo com a equação a seguir:

$$F_{s,k} = F_{e,k}(1 - \xi) \quad (2)$$

onde $F_{s,k}$ é a vazão mássica do componente de referência (ou limitante), k , ao final da reação; $F_{e,k}$ é a vazão mássica deste componente alimentada ao reator ou disponível para a reação; e ξ é o grau de avanço da reação.

Todos os outros componentes da reação têm sua vazão mássica, F_s , calculada a partir dos coeficientes estequiométricos informados, conforme a Equação 3:

$$F_{s,i} = F_{e,i} - F_{e,k} \xi \left(\frac{A_i}{A_k} \right) \quad (3)$$

onde A se refere ao coeficiente estequiométrico, i ao componente em questão e k ao componente de referência.

Este foi o modelo utilizado no presente projeto. O modelo estequiométrico mostra-se adequado, uma vez que o reator opera em modo contínuo por várias semanas, sob condições ambientais controladas e mantidas constantes, de forma que, alguns dias após o início da operação, considera-se atingido o estado estacionário, definido pelos coeficientes estequiométricos.

O modelo cinético do SPD trata as reações, caso exista mais de uma, como ocorrendo simultaneamente. O usuário deve informar, além dos coeficientes estequiométricos, os parâmetros cinéticos da reação, de forma a constituir uma expressão para a taxa da reação (r) com relação ao componente de referência, conforme a Equação 4:

$$r_{k,j} = [\alpha \mu_{m\acute{a}x} (S_1)(S_2) + \beta] (B) \quad (4)$$

onde k indica o componente de referência e j a reação em questão; α e β são constantes; $\mu_{m\acute{a}x}$ é a máxima taxa específica de crescimento da biomassa; e os termos S_1 e S_2 representam expressões cinéticas para dois componentes especificados pelo usuário e B para a biomassa. Estas expressões são definidas pelo usuário através da opção pelos modelos disponíveis, os quais incluem Monod, Haldane, cinética de primeira ordem ou constante.

Desta forma, a taxa para os outros i componentes envolvidos na reação j é definida pela seguinte equação:

$$r_{i,j} = \frac{A_{i,j}}{A_{k,j}} (r_{k,j}) \quad (5)$$

onde os termos são tais como definidos anteriormente.

Caso mais de uma reação esteja envolvida na fermentação, uma taxa combinada para cada componente i é definida como o somatório das taxas reacionais das q reações:

$$r_i = \sum_{j=1}^q r_{i,j} \quad (6)$$

A taxa combinada é utilizada nas equações de balanço de massa, semelhantes à Equação 3, mas nas quais o termo $F_{e,k}\xi(A_i/A_k)$ é substituído por r_iV , onde V é o volume do meio reacional.

É importante salientar que a definição de coeficientes estequiométricos para sistemas biológicos requereria a representação de todas as reações envolvidas no sistema. Contudo, de forma mais realista, este complexo conjunto de reações químicas do metabolismo celular pode ser representado por uma única equação reacional, na qual substratos são convertidos em biomassa e produtos metabólicos, através de um modelo considerado como “caixa preta”.

O cálculo dos coeficientes estequiométricos em um modelo “caixa preta” envolve o conhecimento dos coeficientes de rendimento, os quais, por sua vez, estão relacionados às taxas de consumo de substratos, de produção e de crescimento da biomassa, altamente influenciados pelas condições ambientais e pela taxa de diluição, isto é, a razão entre vazão alimentada ao biorreator e o volume do meio reacional.

Assim, qualquer estequiometria “caixa preta” dada é válida apenas para operação em estado estacionário e, normalmente, apenas para um dado conjunto de condições ambientais (pH, temperatura, concentrações de substratos) (Nielsen *et al.*, 2003).

O detalhamento do cálculo dos coeficientes estequiométricos empregados neste projeto está apresentado na seção IV.2.

III.2.2. Hidrociclone

O hidrociclone é utilizado neste processo como equipamento de retenção celular, como descrito na seção III.1. A separação de partículas pode ser simplesmente definida pelo usuário para cada componente da alimentação do hidrociclone ou calculada pelo modelo com base na distribuição de tamanhos de partículas, informada pelo usuário.

No *software*, a fração de solventes e partículas na fase mais concentrada é determinada pela fração volumétrica de partículas no *underflow*. A eficiência de separação, η , para uma partícula de diâmetro d é dada pela equação:

$$\eta = 100 \left[1 - \exp \left(- \left(\frac{d}{d_{50}} - 0,115 \right)^3 \right) \right] \quad (7)$$

onde d_{50} é o diâmetro de partícula para o qual a eficiência de separação é 50 % e dada pela Equação 8:

$$d_{50} = 4,5 \left[\frac{D_c^3 \mu}{Q^{1,2} (\rho_s - \rho_L)} \right] \quad (8)$$

onde D_c é o diâmetro do corpo do hidrociclone, em cm; μ é a viscosidade da fase líquida, em cP; Q é a vazão volumétrica na alimentação, em L min⁻¹; ρ_L é a densidade do líquido e ρ_s , a do sólido, em g cm⁻³.

Se o usuário assim decidir, o SPD pode dimensionar os equipamentos, selecionando-se a opção *Design Mode* no diálogo de configuração do equipamento, ou o dimensionamento pode ser definido pelo usuário (*Rating Mode*), com o objetivo de avaliar a performance do equipamento.

Em *Design Mode*, o SPD calcula o diâmetro do corpo do hidrociclone utilizando a equação acima. As outras dimensões do hidrociclone são baseadas nesta medida, utilizando-se as seguintes proporções típicas: o diâmetro da alimentação é $D_c/7$; o diâmetro do *overflow* (saída da fração menos concentrada, no topo) é $D_c/5$; o diâmetro do *underflow* (saída da fração mais concentrada, no fundo) é $D_c/10$; o comprimento da seção cilíndrica do corpo é $3 D_c$; e o comprimento total do hidrociclone é $5 D_c$.

No presente projeto, optou-se por definir apenas a eficiência de separação para as células, pela dificuldade adicional que representaria determinar a distribuição de tamanhos de partículas na alimentação. A eficiência informada foi baseada em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Pinto *et al.*, 2008). Além disso, o modelo de hidrociclone implementado no SPD não é adequado para células animais.

III.2.3. Microfiltração

A fração f de um dado componente i no retido ao final do processo de filtração é estimado pela equação:

$$f_i = (CF)^{Ri-1} \quad (9)$$

onde CF é o fator de concentração dado pela razão entre a vazão volumétrica da alimentação e a vazão volumétrica no retido; e Ri é o coeficiente de rejeição do componente i , dado pela unidade subtraída da razão entre as concentrações do componente i ao final da filtração nas correntes permeada e concentrada.

O usuário deve definir CF para a operação e Ri para cada componente. Está claro que o Ri de cada componente será um valor entre zero e um, este último significando que o componente em questão fica completamente retido.

Um dado adicional que o modelo permite definir é a fração do produto de interesse que é desnaturada devido às tensões cisalhantes durante a filtração.

III.2.4. Cromatografia

Os modelos para as operações de equilíbrio, lavagem, eluição e regeneração da coluna cromatográfica são idênticos. O *software* calcula apenas uma das variáveis, entre volume de tampão utilizado, tempo de operação e vazão, depois que o usuário especifica duas delas. O balanço material, por sua vez, decorre da composição da corrente de entrada, também informada pelo usuário.

O volume da coluna pode ser informado (*Rating Mode*) ou calculado (*Design Mode*), a partir do volume de material processado, proveniente da corrente de alimentação da operação de aplicação da amostra (*Load*).

As seguintes condições da operação de aplicação da amostra são informadas pelo usuário: a capacidade adsorptiva da resina, a vazão e, para cada componente, a porcentagem que é adsorvida na resina (*Binding %*) e, desta, a fração que é recuperada na corrente de produto (*Yield %*). O usuário deve, ainda, optar se a função da resina é reter o produto ou as impurezas, para que o *software* direcione a fração adsorvida para a corrente de produto ou de rejeito.

Finalmente, nas operações de CIP, o usuário define o tempo de operação, a vazão e, entre os componentes e misturas registrados, qual é o agente de limpeza.

III.2.5. Diafiltração

Quando em modo batelada, como no presente projeto, a operação de diafiltração é semelhante à de filtração, exceto pelo fato de que a cada um dos n ciclos de filtração, sucede um ciclo de diluição. Assim, a Equação 9, acima, é reescrita como:

$$f_i = (CF)^{n(Ri-1)} \quad (10)$$

Por sua vez, o volume de diluente, V_D , é estimado pela Equação 11, com base no volume inicial alimentado ao equipamento, V_o :

$$V_D = V_o n \left(1 - \frac{1}{CF} \right) \quad (11)$$

III.2.6. Liofilização

Os balanços material e energético da operação de liofilização são baseados na porcentagem dos componentes solventes que são sublimados, dado informado pelo usuário ou calculado com base na porcentagem final de voláteis. A demanda energética total é baseada em dados do consumo específico (por área de bandeja ou por quantidade sublimada) informados pelo usuário.

III.3. Procedimento de Simulação

A simulação é baseada no fluxograma construído pelo usuário, que define as etapas do processo e equipamentos utilizados. Para realizar uma simulação, seja de um processo, seja de um único equipamento, o usuário terá que seguir as seguintes etapas, como definidas no manual do *software* (Intelligen, 2005):

1. especificar o modo de operação;
2. registrar componentes;
3. construir o fluxograma;
4. iniciar operações;
5. iniciar correntes de entrada;

6. iniciar agendamento;
7. definir seções;
8. ajustar parâmetros de convergência;
9. resolver balanços; e
10. analisar resultados.

A primeira etapa é a de definição do modo de operação. O usuário do SPD deve escolher entre modo de operação contínuo ou batelada assim que inicia um novo fluxograma (Figura 3), embora esta opção possa ser modificada em uma etapa posterior (menu *Tasks*, comando *Set Mode of Operation*).

Para este projeto, o modo de operação escolhido foi o batelada, devido à natureza intrinsecamente descontínua das operações de purificação, bem como das etapas de propagação do inóculo. O programa permite a inserção de operações em modo contínuo, mesmo que o modo geral tenha sido definido como batelada, e vice-versa. Assim, definiu-se que o reator e os equipamentos de retenção celular operam em modo contínuo, enquanto os demais operam em batelada.

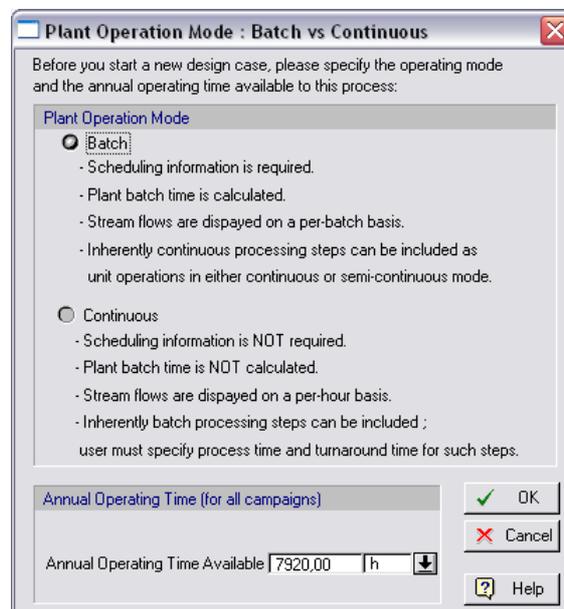


Figura 3. Diálogo de especificação do modo de operação.

Definido o modo de operação da planta e antes de construir o fluxograma, deve-se registrar os componentes e misturas (matérias-primas, intermediários e produtos) que integrarão o processo. O programa permite definir, para estes compostos e misturas, uma série de

propriedades, as quais podem ser levadas em conta nos balanços de massa e energia, cálculo de emissões e avaliação econômica, embora, note-se, várias delas possam ser supérfluas dependendo do que se deseja, de fato, avaliar.

Todos os componentes e misturas utilizados na simulação estão listados na Tabela 7. Os dados mais relevantes inseridos no banco de dados do projeto e as composições das misturas foram listados em uma planilha eletrônica em formato *MSEXcel Spreadsheet (.xls)* (Anexo 1).

Os componentes podem não se referir apenas a substâncias puras, isto é, o usuário pode definir como componente uma mistura complexa de substâncias, com o objetivo de simplificar a simulação. Da mesma forma, o registro de misturas no SPD é feito conforme a conveniência para o usuário.

Tabela 7. Componentes e misturas registrados

Componentes		Misturas
Acetato de Amônio	Hidróxido de Sódio	Air
Água	Histidina	Meio
Célula BHK	Imidazol	NaCl (2 M)
Cloreto de Cálcio	Meio de Cultura	NaOH (0.01 M)
Cloreto de Sódio	Nitrogênio	NaOH (0.1M)
Contaminante	Octoxynol 9	NaOH (0.5 M)
EDTA	Oxigênio	Octoxynol 9 (0.02%)
Embalagem	rFVIII	Tampão A
Etilenoglicol	rFVIII inativo	Tampão B
Fosfato de Sódio Dibásico	Sacarose	Tampão C
Fosfato de Sódio Monobásico	Sorbitol	Tampão D
Gás Carbônico	TNBP	Tampão E
Glicina	Triton X-100	Tampão F
Glicose	WFI	Tampão G
Glutamina		Tampão H

Na definição dos componentes e misturas utilizados nesta simulação levou-se em consideração que os meios de cultura para células animais são misturas extremamente complexas, cuja formulação é definida pelo fornecedor, podendo ou não ser acrescida de outras substâncias conforme a necessidade.

Assim, para efeito desta simulação, não é preciso definir cada substância do meio de cultura, pois, à exceção dos substratos primários, as concentrações são muito baixas ou pouco se alteram durante o desenvolvimento celular. Neste sentido, o meio de cultura foi definido

como uma mistura nomeada simplesmente de “meio” e composta de três componentes apenas: glicose, glutamina (os substratos primários) e todas as outras substâncias (agrupadas sob a denominação “meio de cultura”).

O registro de componentes e misturas é feito através do comando *Edit Pure Components* (Figura 4) e *Edit Stock Mixtures*, ambos no menu *Tasks*. A interface permite ao usuário escolher, dentre os componentes existentes nos bancos de dados, quais devem ser registrados. Além disso, podem-se criar novos componentes que não constem nas bases de dados disponíveis (botão *Add a New Component*).

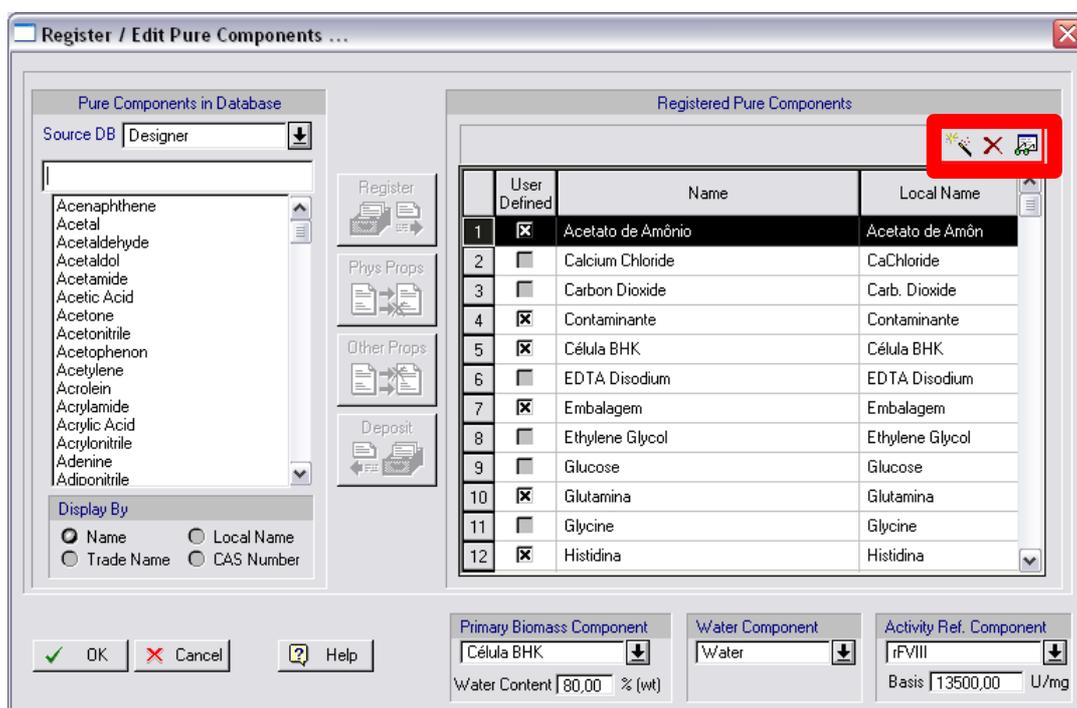


Figura 4. Diálogo de registro de componentes.

Em destaque, da esquerda para a direita, os botões *Add a New Component*, *Delete the Selected Component* e *View/Edit the Selected Component Properties*.

Independentemente se um componente foi criado pelo usuário ou se está contido em uma base de dados, suas propriedades podem ser visualizadas e modificadas através do botão *View/Edit the Selected Component Properties*, que chama o diálogo mostrado na Figura 5, onde se pode especificar, além das propriedades físico-químicas, dados sobre custos (aba *Economics*), para a avaliação econômica, e categoria de poluente (aba *Pollutant Categories*), para avaliação de impacto ambiental.

Finalmente, cabe ao usuário especificar, dentre os componentes registrados, aquele que representa a água no processo (campo *Water Component*, na Figura 4), aquele que é a referência para cálculo de atividade de uma determinada corrente de processo (campo

Activity Ref. Component; neste projeto foi adotado como valor de referência para rFVIII 7000 UI mg⁻¹) e aquele que representa a biomassa no processo (campo *Primary Biomass Component*).

O componente que representa a biomassa é selecionado entre os componentes registrados e que possuem o marcador *Is Biomass?* ativado (Figura 5). Ele será associado às frações intracelulares de outros componentes. Por exemplo, se a biomassa é formada em uma fermentação, o componente que representa água no processo será ajustado no sistema para satisfazer o conteúdo de água da célula (no presente caso, 80 %). Da mesma forma, se a biomassa é removida em um processo, as frações intracelulares dos outros componentes serão também removidas do processo.

Pure Component Properties for : Acetato de Amônio

IDs | Physical (Constant) | Physical (T-dependent) | Aqueous | Economics | Pollutant Categories

Name: Acetato de Amônio

User Defined?

Trade Name: Acetato de Amônio

Formula: C2H7NO2

CAS Number: 631-61-8

Company ID: Acetato de Amônio

Is Biomass?

Local Name: Acetato de Amôn

OK Cancel Help

Figura 5. Diálogo de edição das propriedades do componente

A seguir, é necessário construir o fluxograma. Recomenda-se realizar as etapas 3, 4, 5, 6 e 9 para cada equipamento (ou unidade) adicionado ao fluxograma, que é então construído progressivamente.

A modelagem de processos no SPD é estruturada em procedimentos unitários (*unit procedures*) e operações (*operations*). O procedimento unitário é definido como um conjunto

de ações sequenciais (as operações) que ocorrem em um mesmo equipamento. Assim, cada procedimento unitário é representado por um ícone e está associado a um equipamento.

Embora, de maneira geral, um procedimento unitário corresponda a um único equipamento e se possa dispensar a distinção entre estes conceitos, particularmente nos processos que operam continuamente, um único procedimento unitário pode englobar mais de um equipamento (ou unidade), operando em paralelo, e incluir equipamentos acessórios. Além disso, um único equipamento pode ser compartilhado por mais de um procedimento unitário, se isto for adequado aos objetivos do projeto.

Em um procedimento unitário, os dados de saída de uma determinada operação serão os dados de entrada da outra e assim sucessivamente. Os dados de entrada da primeira operação em um procedimento unitário serão definidos pela corrente de entrada e, da mesma forma, os dados de saída da última operação serão transferidos para o procedimento seguinte.

Cada procedimento unitário é selecionado através do menu *Unit Procedures*. Aqui se encontra todo o repertório de modelos do SPD para o dimensionamento de equipamentos. Selecionado o procedimento unitário desejado, basta adicioná-lo ao fluxograma na posição desejada.

Ao se clicar com o botão direito no ícone do procedimento unitário, abre-se o menu de opções para aquele procedimento (também acessível através do menu *Edit>Unit Procedure Options*). O repertório de modelos de operações disponíveis para aquele procedimento unitário (Figura 6) é revelado na opção *Add / Remove operations...*, caso o modo de operação do procedimento unitário tenha sido especificado para batelada. Caso o equipamento opere em modo contínuo, haverá apenas uma operação associada àquele procedimento.

Outras configurações para o projeto também são acessadas através do menu de opções do procedimento unitário. Os parâmetros de dimensionamento, custos etc. do equipamento, cada qual com sua aba específica, são acessadas na opção *Equipment data....* A especificação do modo de operação do equipamento está em *Procedure data....* Dependendo do procedimento, há também a opção de se definir o conteúdo inicial do equipamento, não sendo necessário definir uma corrente de entrada, acessando-se *Initial equipment contents....*

Não se iniciou a construção do presente fluxograma não pela propagação de inóculo, mas pelo biorreator operando em batelada. Esta opção se deve à dificuldade maior em se simular

a operação do biorreator com reciclo de células. Neste caso, o inóculo era representado apenas como uma corrente de entrada adicional.

Posteriormente foram incluídos na simulação os equipamentos relativos à propagação do inóculo. Note-se que, por uma limitação do *software* ou do usuário, não foi possível representar a operação de inocular o biorreator apenas no início da operação do mesmo. O *software* considera que a propagação ocorre a cada batelada (aqui definida como equivalente a um ciclo de purificação). Observe-se, porém, que esta falha, neste caso específico, não interferiu significativamente na simulação da perfusão, pois a quantidade de células retidas e realimentadas ao biorreator é muito superior à fornecida pelo inóculo.

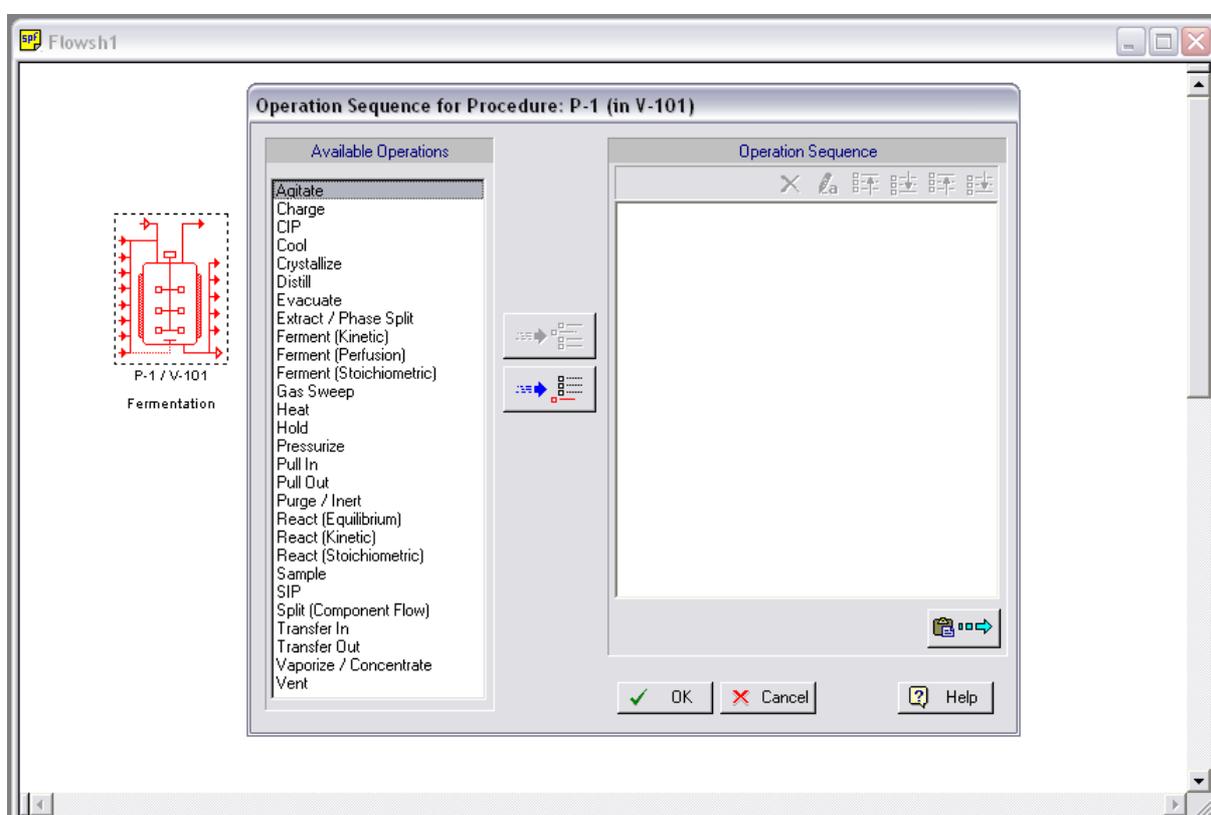


Figura 6. Especificação das operações de um procedimento unitário.

Na sequência do fluxograma, o primeiro procedimento do projeto é um criotubo (de fato, um tubo de ensaio: *Unit Procedures>Inoculum Preparation>In a Test Tube*), adicionado apenas para representar a fonte inicial de biomassa.

A seguir, foram inseridos os frascos agitados (*Unit Procedures>Inoculum Preparation>In a Shake Flask*) e para cada um deles as operações *Charge*, que define a quantidade de meio adicionada ao frasco; *Transfer In*, que define a transferência do conteúdo do criotubo ou do

frasco agitado anterior para o frasco; *Ferment*, representando a multiplicação das células; e *Transfer Out*, que corresponde à operação *Transfer In* do equipamento seguinte.

O modelo de fermentação foi o mesmo para os frascos agitados e biorreator em perfusão. O cálculo da estequiometria em “caixa preta” da reação foi realizado utilizando-se os balanços para cada elemento e valores de coeficientes de rendimento obtidos da literatura. O cálculo está detalhado na seção IV.2.

Para cada equipamento da etapa de propagação, assim como no biorreator em perfusão, foram inseridas correntes de entrada de meio, de ar e de saída de gases, identificadas pelas iniciais M, A e V, respectivamente.

A inserção de correntes é feita ao clicar no botão *Connect Mode*, em destaque na Figura 7. A conexão entre equipamentos é feita em modo de conexão entre uma porta de saída e outra de entrada, representadas pelas setas nos ícones dos equipamentos.

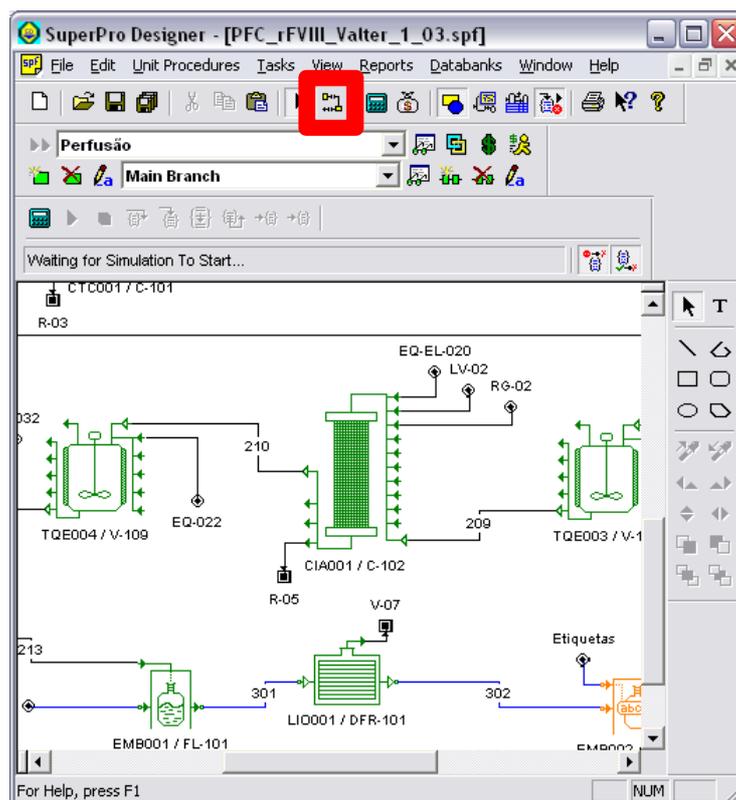


Figura 7. Fluxograma com correntes contínuas e discretas. Em destaque o botão *Connect Mode*.

As setas vazadas são as preferenciais para cada equipamento. As correntes conectadas nestes pontos são interpretadas pelo SPD como entradas e saídas do fluido de processo (e não de

rejeito, por exemplo), de modo que, quando operando em batelada, não é necessário definir operações de transferência para que o conteúdo de um equipamento seja transferido a outro.

Ainda sobre correntes de processo, o SPD representa na cor azul, por padrão, as correntes discretas, isto é, correntes do processo que transportam um número limitado de porções definidas, de forma descontínua, em vez do escoamento contínuo de fluido, ou mesmo de sólidos fragmentados. Da mesma forma, as entradas e saídas discretas são representadas por setas com círculos.

Finalmente, para que o tempo da etapa de propagação não fosse levado em consideração a cada ciclo de purificação, todos os procedimentos tiveram o marcador *Omit from Scheduling* selecionado (Figura 8), o que significa que o tempo de operação destes equipamentos não será considerado no cálculo do tempo de uma batelada e não aparecerá no diagrama de Gantt do processo.

O biorreator principal foi definido como um biorreator contínuo (selecione-se a opção correspondente na configuração do procedimento, conforme visto na Figura 8). O dimensionamento do equipamento foi definido conforme o cálculo da capacidade da planta (seção IV.1).

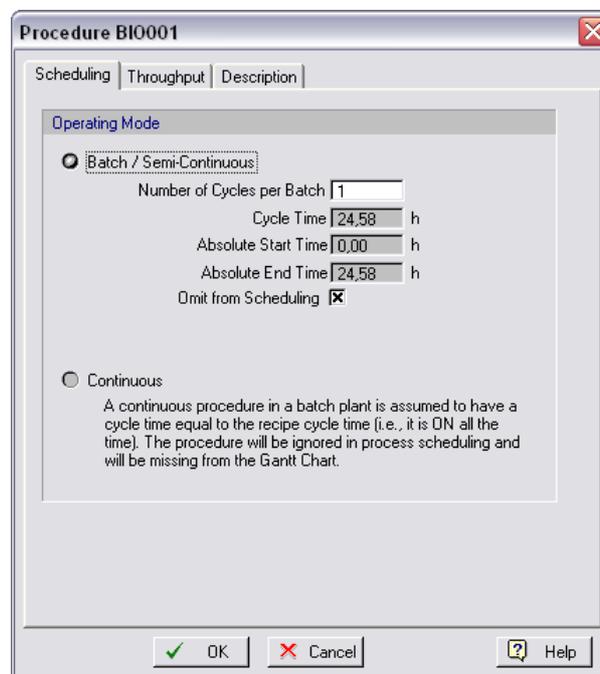


Figura 8. Parâmetros do procedimento unitário.
A opção *Omit from Scheduling* está marcada.

A taxa de aeração foi definida como 0,1 vvm, típica para cultivos de células animais, sendo suficiente para atender o metabolismo celular. A relação estequiométrica foi definida da mesma forma, tanto na propagação de inóculo, quanto na operação do biorreator. No entanto, enquanto o avanço da reação foi definido como o necessário para atingir a concentração celular de $1,0 \times 10^6$ células mL^{-1} nas etapas de propagação, este valor foi alterado para $2,0 \times 10^7$ células mL^{-1} , típico para reatores homogêneos operando em perfusão (Heidemann *et al.*, 2005; Chico *et al.*, 2008).

O hidrociclone foi configurado no SPD utilizando-se os valores especificados por Silveira *et al.* (2005). No dimensionamento em *Design Mode*, é necessário informar a queda de pressão, que no presente caso é de 1,35 bar. Nas condições do processo, é necessário informar a velocidade de alimentação e a fração volumétrica de partículas no *underflow*. Como o diâmetro de corpo informado é $D_c = 10$ mm, tem-se que o diâmetro da alimentação será, segundo o SPD, $D_c/7$, de modo que a vazão de alimentação de $1,4 \text{ L min}^{-1}$, adotada conforme Silveira *et al.* (2005), resulta em:

$$\frac{\frac{1,4 \text{ L}}{\text{min}} \times \frac{0,001 \text{ m}^3}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}}{\frac{\pi \left(\frac{10 \text{ mm} \times \frac{1 \text{ m}}{1000 \text{ mm}} \right)^2}{4}}{4}} = 14,557 \text{ m/s}$$

Quanto à fração volumétrica de partículas no *underflow*, é necessário saber de antemão qual será a concentração celular no *underflow*. Segundo Pinto *et al.* (2008), a eficiência total ou eficiência de separação celular é de 97 % e a razão de fluido é 75 %. Assim, uma vez que a concentração celular na saída do reator é de $2,0 \times 10^7$ células mL^{-1} , como definido anteriormente, a concentração celular no *underflow*, X_u , será:

$$X_u = \frac{0,97 \times 2,0 \times 10^7 \text{ células/mL}}{0,75} = 2,6 \times 10^7 \text{ células/mL}$$

Tomando-se o diâmetro médio de $15 \mu\text{m}$ por célula, tem-se que o volume aproximado de uma célula é:

$$\frac{\pi}{6} \left(15 \mu\text{m} \times \frac{1 \text{ cm}}{10000 \mu\text{m}} \right)^3 = 1,77 \times 10^{-9} \text{ cm}^3$$

Assim, a fração volumétrica de partículas no *underflow* será:

$$\frac{2,6 \times 10^7 \text{ células}}{\text{mL}} \times \frac{1,77 \times 10^{-9} \text{ cm}^3}{1 \text{ célula}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ cm}^3} = 0,046$$

Estes valores resultam na opção pela utilização de dois hidrociclones de 0,7 cm de diâmetro de corpo. No entanto, por já estar bem caracterizada a operação do hidrociclone descrito em Silveira *et al.* (2005), o dimensionamento foi alterado para *Rating Mode*, informando-se o diâmetro do corpo, 10 mm, e número de unidades, 1, no diálogo apresentado na Figura 9.

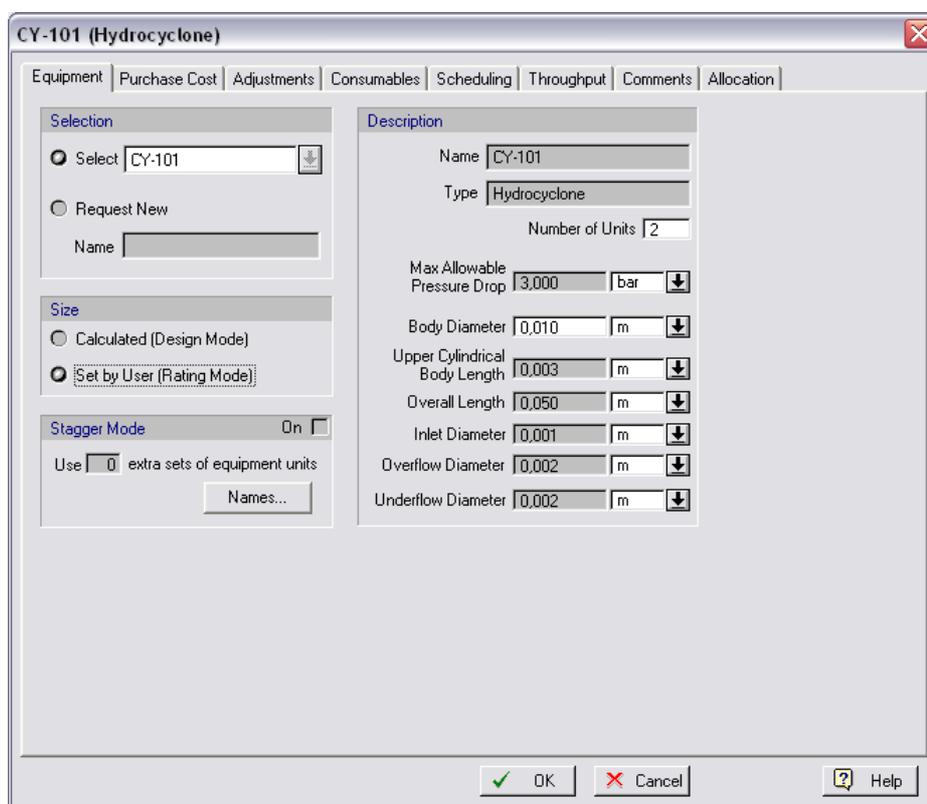


Figura 9. Dimensionamento do hidrociclone.

A fração de partículas no *underflow* foi determinada de modo a se obter uma razão de fluido de aproximadamente 75 %. O valor utilizado foi 0,049 (Figura 10).

Para a simulação dos tanques de equalização, especificou-se apenas o volume total em *Rating Mode*. Os valores adotados para máximo permitido para a razão entre volume útil e volume total e para razão altura/diâmetro foram os padrões do SPD (90 % e 3, respectivamente).

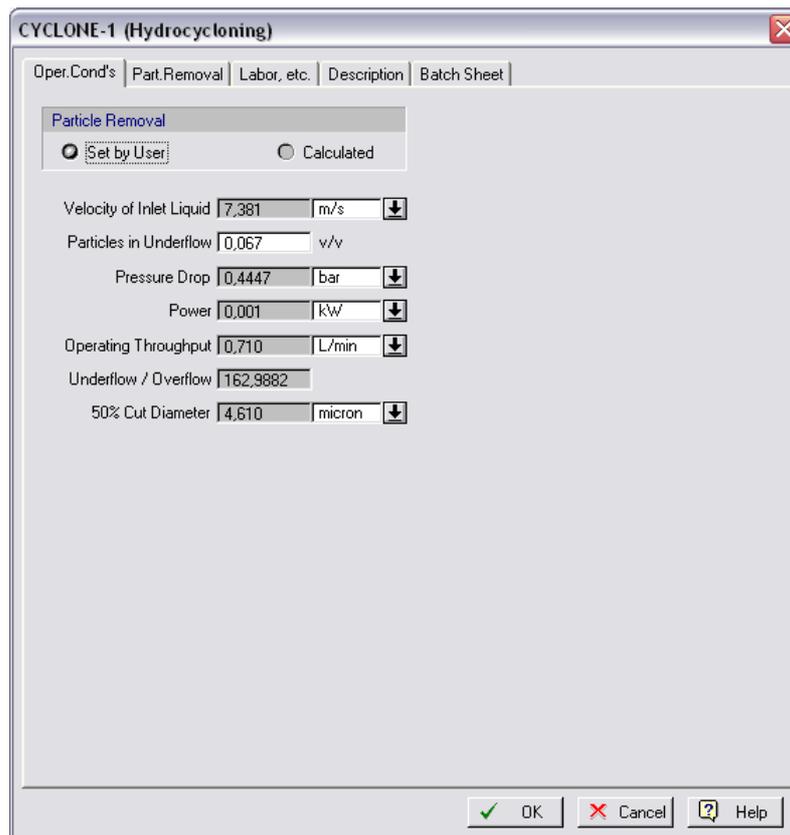


Figura 10. Especificação das condições de operação do hidrociclone.

Apenas o primeiro tanque de equalização irá operar continuamente. A partir do primeiro módulo de microfiltração, os equipamentos operam em modo batelada, tal como os equipamentos de propagação. No entanto, a partir da operação do primeiro módulo de microfiltração, é necessário iniciar o agendamento das operações, isto é, definir em que momento do processo elas se iniciam, através da aba de configuração da Figura 11.

O início da operação do primeiro módulo de microfiltração marca o início da purificação do processo, operando em batelada e determinando a duração de um ciclo de produção. Definiu-se assim que todas as operações se iniciariam sempre ao final da anterior. No entanto, no caso dos procedimentos que se seguem a uma etapa de cromatografia, a primeira operação do procedimento unitário se inicia logo após a operação de eluição, visto que as etapas de regeneração e sanitização destinam-se apenas à recuperação da resina cromatográfica. Outra exceção foi feita na etapa de inativação viral, em que a agitação e o resfriamento devem ocorrer simultaneamente.

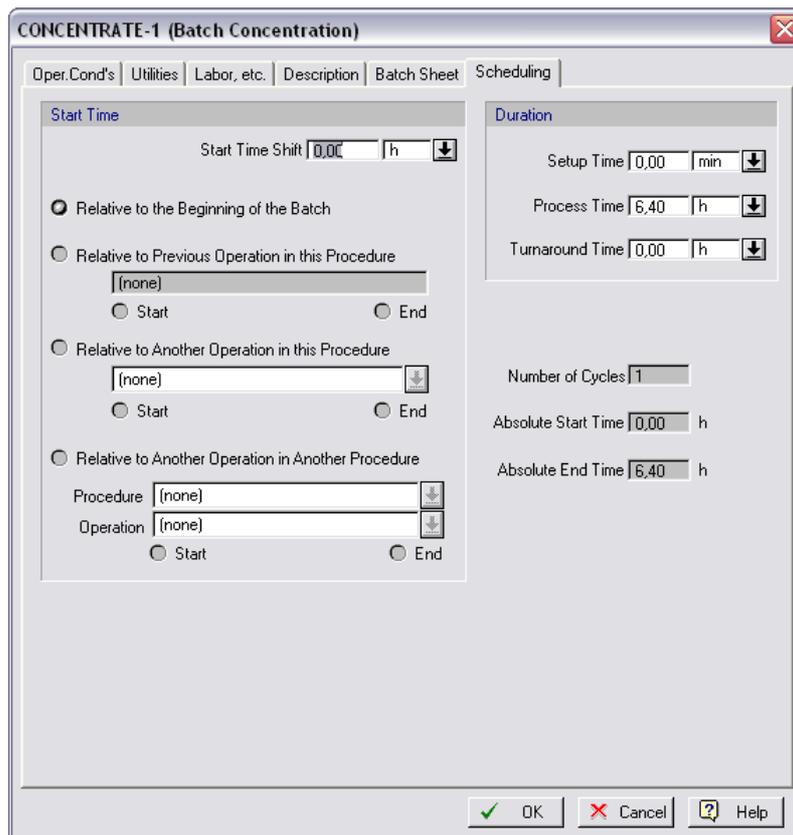


Figura 11. Configuração de agendamento de operações.

Ainda com relação ao agendamento de operações, verifica-se que o tempo necessário para se completar um ciclo de purificação é maior que um dia, embora os equipamentos que realizam as primeiras operações de purificação já estejam disponíveis antes que se complete um ciclo. Assim, pode-se definir ainda dados de agendamento relativos a todo o processo, tais como o número anual de bateladas e o tempo necessário para que se inicie uma nova batelada, acessando-se o menu *Tasks>Recipe Scheduling Information* (Figura 12).

Neste caso, definiu-se o tempo anual de operação para 7200 h (300 dias), o número de campanhas, isto é, o número de ciclos de produção por ano, para 2 e o tempo de início da batelada seguinte como o mínimo possível, definindo-se *Cycle Time Slack* para zero. Ainda, definiu-se que o número de bateladas por ano seria de 290, isto é, duas campanhas de 145 ciclos de purificação, os quais teriam a duração aproximada de 24 h, conforme Silveira *et al.* (2005).

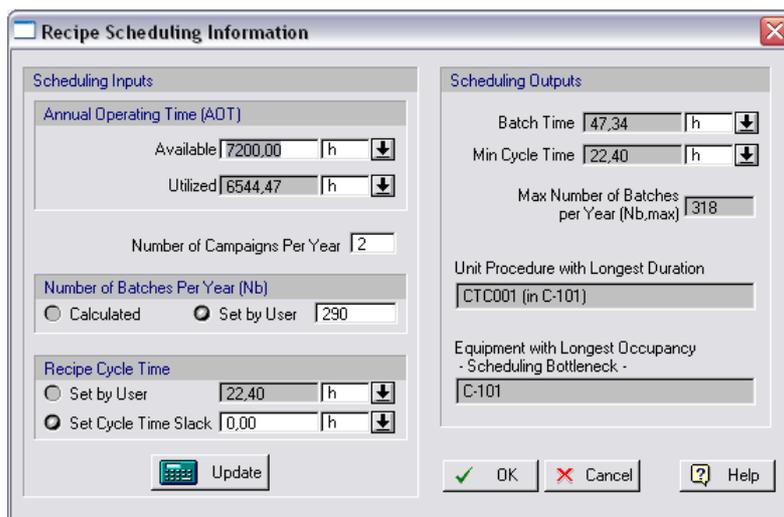


Figura 12. Opções de agendamento do processo

Para simulação dos módulos de microfiltração, definiu-se a área de membrana na configuração do equipamento, de acordo com os dados disponíveis e descritos na seção III.1.3: 1,8 m² de área de filtração na tela de dimensionamento dos equipamentos e 85 L m⁻² h⁻¹ para o fluxo de filtrado no diálogo de configuração da operação de microfiltração, mostrado na Figura 13.

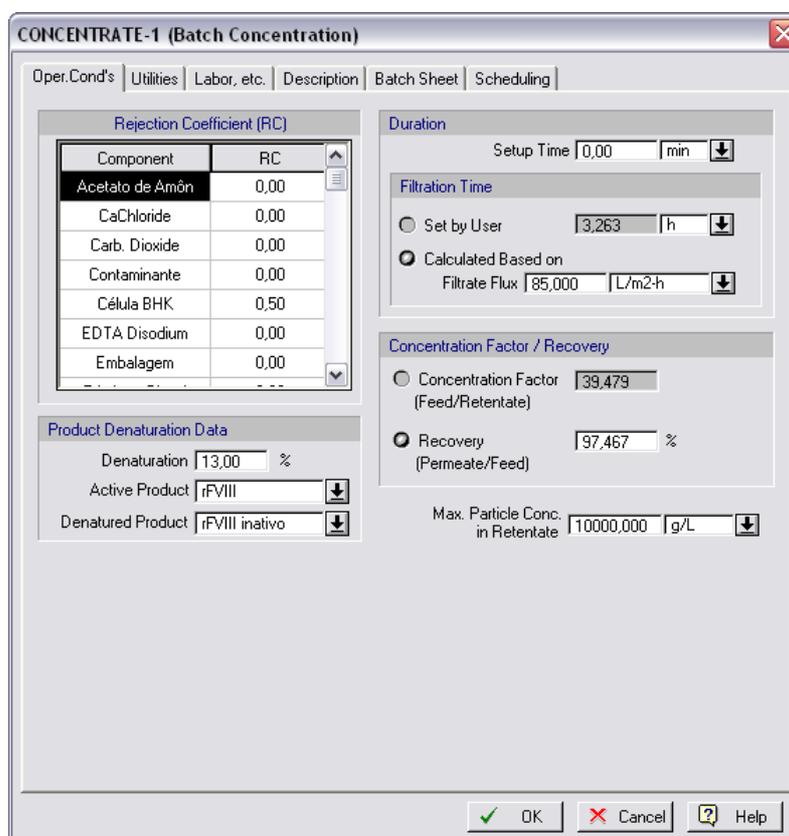


Figura 13. Configuração da operação de microfiltração

O fator de concentração foi definido em termos de recuperação, isto é, a porcentagem da vazão alimentada que é recuperada no filtrado, que deve ser de 97,467 % para se obter o rendimento de 95 % na etapa de microfiltração. Valores maiores que zero para coeficientes de rejeição (RC) foram determinados apenas para o componente Célula BHK (0,5 no primeiro e 1,0 no segundo), já que nesta etapa são eliminados todas células não retidas no hidrociclone e *debris* celulares (que não foram registrados como componente, estando incluídos no componente Célula BHK⁵). Foi necessário aumentar o valor de concentração máxima de partículas no retido para que fosse possível a separação tal como configurada.

Observe-se, ainda na Figura 13, que foi incluído um valor de 13% de desnaturação do produto. Este valor não é típico para esta operação. No entanto, o rFVIII é uma molécula muito sensível e verifica-se que a maior parte dos processos de produção de rFVIII operam em condições tais que o rendimento global é cerca de 30 a 35 %, de modo que perdas adicionais foram distribuídas entre os equipamentos, para que o processo ora simulado se aproximasse do desempenho de processos estabelecidos industrialmente.

Para simulação das colunas de cromatografia, as dimensões das colunas foram especificadas conforme descrito na seção III.1 (Figura 14).

Da mesma forma, foram especificados a velocidade linear, o volume de solução (em volumes de coluna, BV) e as composições dos tampões das operações de equilíbrio, lavagem e regeneração (Figura 15). As correntes no fluxograma estão indicadas por sua função: EQ para equilíbrio; EL para eluição; LV para lavagem; RG para regeneração.

No diálogo das condições operacionais da aplicação da amostra (*Load*; Figura 16), especificou-se a capacidade adsorptiva da resina, a vazão de operação, a função (para as duas primeiras, reter produto; para a última, reter impurezas), a porcentagem de produto retido e, desta, a porcentagem recuperada. Estes últimos valores foram definidos de acordo com o rendimento de cada etapa cromatográfica.

A Figura 17 mostra a configuração da operação de eluição. Há a opção de se usar mais de um tampão de eluição para os casos em que a eluição se dá em um gradiente. No presente projeto, no entanto, foi utilizado apenas um tampão para cada coluna, de modo que a opção eluição isocrática está selecionada.

5 De fato, o coeficiente de rejeição para célula BHK no primeiro módulo seria de 1,0, devido ao tamanho de poro da membrana ser menor que o diâmetro da célula. No entanto, alguns componentes intracelulares só seriam retidos no segundo módulo. Como a simulação não prevê a existência de componentes intracelulares no fluido de processo, o coeficiente de rejeição para o componente “célula BHK” foi definido como menor que 1,0.

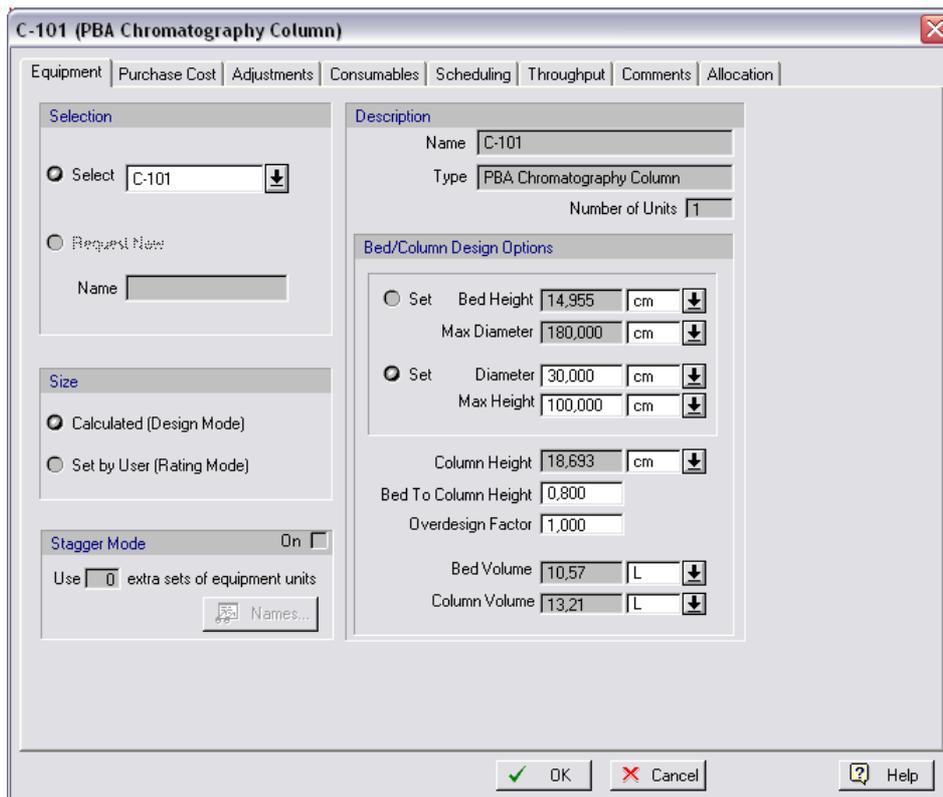


Figura 14. Dimensionamento das colunas cromatográficas.

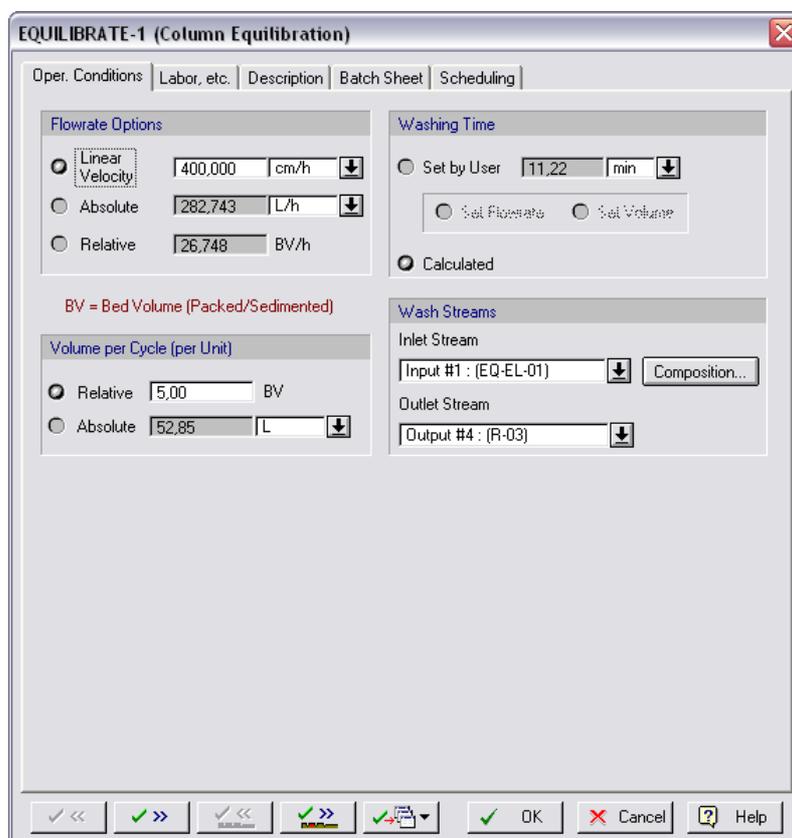


Figura 15. Configuração da operação de equilíbrio.
Os diálogos para as operações de lavagem e regeneração são iguais.

LOAD-1 (PBA Column Loading)

Oper. Cond's | Labor, etc. | Description | Batch Sheet | Scheduling

Resin Binding Capacity (under operating conditions) 20,000 g/L

Loading Flowrate

Linear Velocity 400,00 cm/h

Absolute Flowrate 282,74 L/h

Relative Flowrate 26,75 BV/h

BV = Bed Volume (Packed/Sedimented)

Resin's Primary Function

Retain Product Retain Impurities

Component Binding and Yield Data

Component	Binding %	Yield %	Ignore in Sizing?
Acetato de Amôn	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>
CaChloride	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>
Carb. Dioxide	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>
Contaminante	30,00	20,00	<input type="checkbox"/>
Célula BHK	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>
EDTA Disodium	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>
Embryos	0,00	0,00	<input type="checkbox"/>

Resin Binding Capacity Utilization

Calculated Set by User 100,00 %

Waste

Outlet Stream Output #4 : (R-03)

Navigation: << >> <<< >>> <> OK Cancel Help

Figura 16. Configuração da operação de aplicação da amostra.

ELUTE-1 (Column Elution)

Oper. Conditions | Labor, etc. | Description | Batch Sheet | Scheduling

Eluant Volume

Total Volume 5,000 BV

Volume in Product Stream 5,000 BV

Flowrate Options

Linear Velocity 400,00 cm/h

Absolute Flowrate 282,74 L/h

Relative Flowrate 26,75 BV/h

BV = Bed Volume (Packed/Sedimented)

Elution Strategy

Isocratic Gradient

Key Component Data

Name (none)

Initial Conc. 0,000 g/L

Final Conc. 0,000 g/L

Eluant (A)

Inlet Stream Input #1 : (EQ-EL-01) Composition...

Volume per Cycle 52,85 L

Eluant (B)

Inlet Stream (none) Composition...

Volume per Cycle 0,00 L

Waste

Outlet Stream Output #4 : (R-03)

Navigation: << >> <<< >>> <> OK Cancel Help

Figura 17. Configuração da operação de eluição.

Na configuração da operação de sanitização e de manutenção, representadas como operações de CIP, não é necessário inserir uma corrente de entrada. O agente de limpeza é selecionado entre os componentes e misturas registrados. O consumo foi calculado com base nos dados de volume do leite e consumo em volumes de coluna, conforme descrito na seção III.1, assim como a duração das operações de manutenção.

No caso em que a coluna é mantida na solução de manutenção até o dia seguinte, conforme Silveira *et al.* (2005), quando se inicia um novo ciclo de purificação, o tempo de operação foi definido em 18 h.

Não foi possível inserir na simulação exceções como o caso das operações de *cleaning-in-place* de fato, que são realizadas a cada 5 ciclos. Todas as operações estão incluídas em todos os ciclos. Deste modo, as referidas exceções foram desconsideradas.

Na simulação dos tanques de inativação viral, foram utilizadas as operações de agitação e resfriamento, bem como a adição de solvente e detergente, fornecidos por correntes separadas e identificadas no fluxograma. Esta etapa foi realizada meio de uma operação *Charge*, especificando-se o volume adicionado e cujo tempo de operação foi calculado tendo por base a vazão de operação da coluna de troca catiônica (cerca de 300 kg h⁻¹).

Nas operações de agitação e resfriamento, foram mantidos os valores padrão do SPD para consumo energético e dados do agente de resfriamento. Foram especificados apenas a temperatura, 24 °C, e o tempo de operação, 1 h para o primeiro tanque e 5 h para o segundo. Por fim, uma vez que foram especificados os volumes adicionados, o dimensionamento foi calculado pelo *software (Design Mode)*.

A perda de produto na etapa de inativação viral não foi simulada nos equipamentos específicos, tendo sido acumulada na etapa seguinte, de diafiltração. Assim o rendimento simulado para a etapa de diafiltração foi considerado 81 %, em vez dos 95 % descritos na seção III.1.

Na simulação do primeiro módulo de diafiltração, definiu-se a área da membrana (0,1 m²) nas opções do equipamento. Na configuração da operação, semelhante à operação de microfiltração, estabeleceu-se o coeficiente de rejeição de Célula BHK (ainda que não estejam presentes na corrente), de Contaminante e de rFVIII em 1. Para contabilizar a perda de produto, estabeleceu-se que 19 % do rFVIII é desnaturado em rFVIII inativo.

Foram informados também fluxo de filtrado ($250 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) e o volume de troca (4,5 vezes o de alimentação). A solução alimentada ao módulo de diafiltração é o tampão de equilíbrio da próxima etapa de cromatografia. Além disso, há uma operação de limpeza e desinfecção, a qual foi simulada como uma operação de CIP.

Para a simulação do segundo módulo de diafiltração, na parte final do processo, foi necessário realizar uma diluição prévia, com o objetivo de se obter na saída do módulo de diafiltração a exata composição do produto formulado, conforme especificado na Tabela 6. A diluição é realizada com um misturador de correntes (*Unit Procedures>Mixing>Bulk Flow>2-Stream*), configurado para operar em modo contínuo e dimensionado pelo SPD.

O volume de diluente que entra no processo pela corrente F-01, V_{F1} , foi calculado tomando como meta para a atividade da corrente 214 o valor de $222,22 \text{ UI mL}^{-1}$, de forma a se obter na ampola contendo 2,5 mL de produto formulado 500 UI de rFVIII, já considerando a perda de 10 % na etapa de liofilização.

Como esta segunda diafiltração também será realizada a volume constante e as perdas nesta etapa são de 5 %, tem-se que a atividade na corrente 213, logo após a diluição, deverá ser de $233,92 \text{ UI mL}^{-1}$. Assim, calcula-se a diluição a partir dos dados da corrente 212, que sai da coluna de troca aniônica, os quais podem ser visualizados acessando-se o menu *Edit>Stream Options>Simulation Data...* com a corrente em questão selecionada (Figura 18).

Verifica-se que a vazão volumétrica da corrente 212 é 4,045 L por batelada e que a atividade em solução é $959,55 \text{ UI mL}^{-1}$. O valor de V_{F1} então será:

$$V_{F1} = 4,045 \text{ L batelada}^{-1} \times \left(\frac{959,55 \text{ UI mL}^{-1}}{233,92 \text{ UI mL}^{-1}} - 1 \right) = 12,548 \text{ L batelada}^{-1}$$

A composição da corrente F-01 será a mesma da F-02, ou seja, a composição mássica da solução formulada.

Dados adicionais para a simulação do segundo módulo de diafiltração são: $0,1 \text{ m}^2$ de área de filtração, volume de troca igual a 4,5 vezes o volume inicial, tempo de filtração de 30 minutos e desnaturação de 5 % do rFVIII em rFVIII inativo, ambos com coeficiente de rejeição igual a 1,0.

Stream 212 (CTA001 --> DIL001)

Composition, etc. | Density | Env. Properties | Comments

Composition Data

	Component	Flowrate (kg/batch)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	CaChloride	0,01191	0,2920	2,944790	100,00
2	Histidina para	0,02345	0,5748	5,796627	100,00
3	Imidazol	0,00165	0,0404	0,407427	100,00
4	Octoxynol-9	0,00042	0,0103	0,103971	100,00
5	rFVIII	0,00055	0,0136	0,137078	100,00
6	Sodium Chloride	0,08388	2,0565	20,739562	100,00
7	Water	3,95708	97,0124	978,340713	100,00

Total Flowrates

Mass Flow 4,079 kg/batch

Volumetric Flow 4,045 L/batch

Temperature 298,15 K

Pressure 101,300 kPa

Activity 959,55 U/mL

Units Mass in kg Volume in L Composition in % Conc. in g/L

Time Ref. for Flows Batch Source Cycle Destination Cycle h Time Average h

OK Cancel Help

Figura 18. Dados da corrente 212, que sai da coluna de troca aniônica.

A simulação das operações de enchimento das ampolas antes da liofilização e de empacotamento do produto liofilizado é bastante simples, bastando informar a quantidade de solução formulada por ampola e a quantidade de ampolas por caixa: 3,0 mL (prevendo perda na armazenagem e reconstituição) e 1, respectivamente. O tempo de operação foi definido nos dois casos como 60 minutos, o padrão do SPD.

Finalmente, a simulação do liofilizador requer que o usuário insira os dados relativos aos componentes removidos, isto é, se eles são voláteis e qual a quantidade removida, no caso, 100 % da água e, para simular a perda de produto, 10 % do rFVIII. É necessário informar, ainda, o tempo de liofilização, 6,0 h como padrão, e a área de cada ampola, estimada em 2,250 cm², que será levada em conta no dimensionamento do equipamento.

III.4. Análise econômica

Para a análise econômica do processo, é necessário definir alguns parâmetros para a análise, os principais sendo os preços das matérias-primas, dos equipamentos, dos produtos e dos recursos utilizados (mão de obra, consumíveis, utilidades) durante o processo.

Os preços das matérias primas foram definidos na etapa de registro de componentes, tendo sido o preço unitário informado e o preço das misturas, calculado a partir dos seus constituintes. Os valores, exceto para o meio de cultivo, foram obtidos de Silveira *et al.* (2005) e estão relacionados na planilha do Anexo 1.

Os custos dos equipamentos foram determinados pelo modelo interno do SPD. O *software* atualiza o custo dos equipamentos para o ano de análise, 2010, com base no valor informado para a inflação (no menu *Edit>Flowsheet Options>Economic Evaluation Parameters...*). Neste projeto, o valor da inflação, 4,7 %, foi calculado com base na média das taxas anuais no Brasil dos anos de 2005 a 2009 (BCB, 2010).

O custo dos materiais consumíveis adotado também foi oriundo de Silveira *et al.* (2005) e os preços estão relacionados na respectiva planilha do Anexo 1. Para que estes materiais pudessem ser associados aos equipamentos, foi necessário registrá-los no banco de dados do SPD (menu *Databanks>Consumables*).

O custo da mão de obra e das utilidades está baseado nos padrões do SPD, isto é, não foram alterados os valores padrão para o consumo específico de utilidades em um equipamento ou operação, nem os da demanda de mão de obra para cada operação.

O preço de venda do produto estabelecido foi de USD 0,23 UI⁻¹, conforme o preço pago na última licitação. Portanto, cada unidade com 500 UI seria vendida por USD 115,00 e este valor foi informado nas propriedades da corrente Produto. Para que o SPD tenha a informação sobre custos de tratamento de rejeitos e receitas obtidas com os produtos, é necessário classificar as correntes (menu *Tasks>Stream Classification*) no diálogo mostrado na Figura 19.

Particularmente, é importante determinar o custo de tratamento dos rejeitos aquosos, uma vez que não foi informado o custo de tratamento de cada componente para que o SPD pudesse realizar o cálculo. Assim, apenas para que este custo não fosse desconsiderado, estimou-se que o custo de tratamento dos rejeitos aquosos seria de 10 USD kg⁻¹.

Finalmente, foram ajustados os parâmetros da avaliação econômica (menu *Edit>Flowsheet Options>Economic Evaluation Parameters...*). A princípio, apenas os parâmetros da aba *Time Valuation* (Figura 20) foram ajustados.

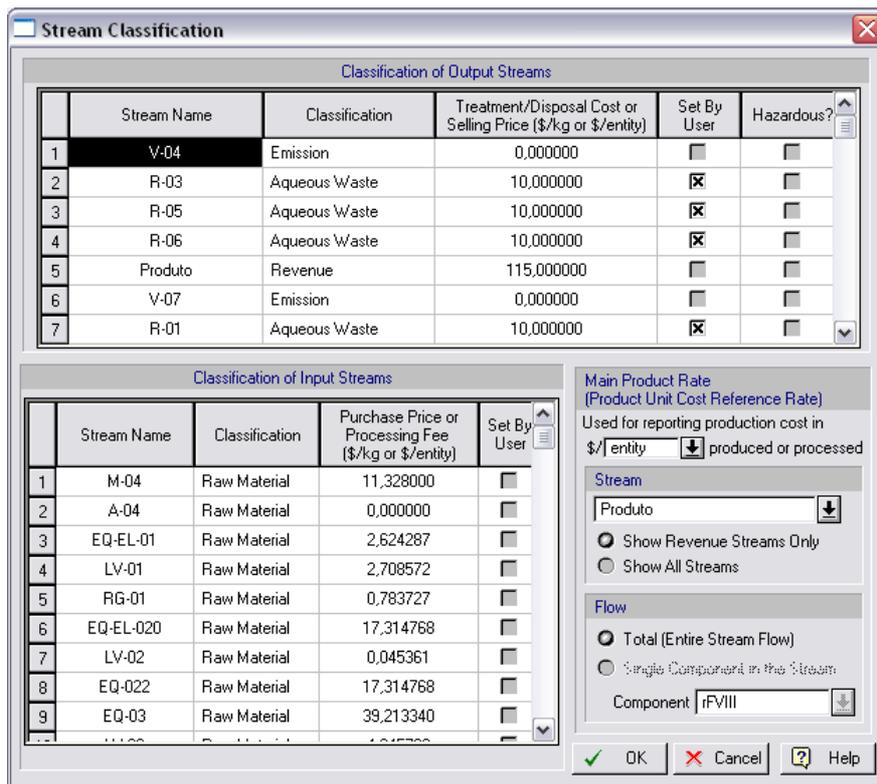


Figura 19. Diálogo de classificação das correntes.

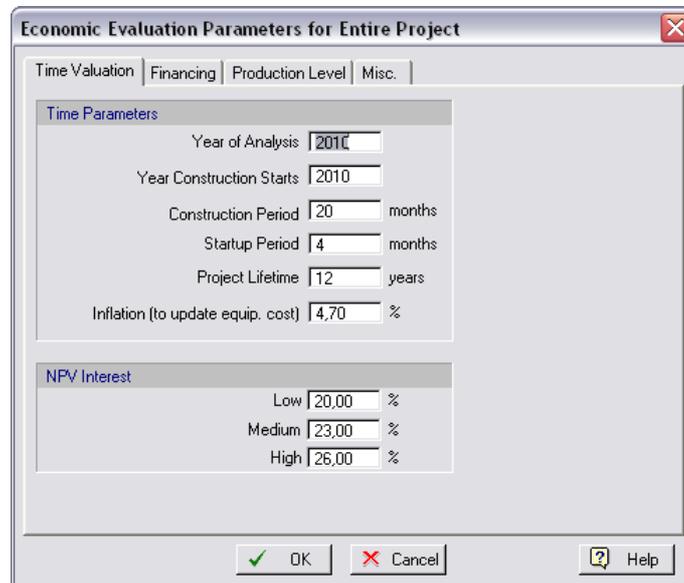


Figura 20. Definição dos parâmetros da avaliação econômica.

Os parâmetros temporais são o ano da análise e o da construção (neste caso, 2010), a taxa de inflação (4,7 %, como mencionado anteriormente), o tempo necessário para construção e início da operação (20 e 4 meses, respectivamente), o tempo de vida do projeto, o qual deve incluir o tempo de construção e início da operação, totalizando, portanto, 12 anos.

Com relação aos parâmetros para o cálculo do VPL, deve-se levar em conta o alto risco e o alto retorno dos investimentos feitos. Conforme Silveira *et al.* (2005), a TMA adotada para empreendimentos da área biotecnológica deve ser de 20 %, tendo sido adotadas a taxa média de 23 % e a máxima de 26 %.

Finalmente, com o objetivo de contabilizar os custos adicionais relativos à construção das salas limpas, o fator de custo relativo a instalações (*Buildings*) foi dobrado⁽⁶⁾. Isto é feito nas opções de ajuste de custos de investimento de cada seção (menu *Edit>Flowsheet Options>Section>Capital Cost Adjustments...*), mostradas na Figura 21.

The dialog box 'Section: Perfusão (Capital Investment)' contains the following information:

- DFC:** Direct Fixed Capital (DFC) is 9228,68 thous.\$.
- DFC Estimation:** Direct Fixed Capital (DFC) = Direct Cost (DC) + Indirect Cost (IC) + Other Cost (OC).
- Direct Cost (DC):**
 - Piping (A): 0,35 x PC
 - Instrumentation (B): 0,40 x PC
 - Insulation (C): 0,03 x PC
 - Electrical Facilities (D): 0,10 x PC
 - Buildings (E): 0,90 x PC
 - Yard Improvement (F): 0,15 x PC
 - Auxiliary Facilities (G): 0,40 x PC
- Indirect Cost (IC):**
 - Engineering (H): 0,25 x DC
 - Construction (I): 0,35 x DC
- Other Cost (OC):**
 - Contractor's Fee: 0,05 x (DC + IC)
 - Contingency: 0,10 x (DC + IC)
- Equipment Purchase Cost (PC) Estimation:**
 - Purchase Cost (PC) = Equipment Cost + Unlisted Equipment Purchase Cost
 - Unlisted Equipment Purchase Cost: 0,20 x PC
 - Unlisted Equipment Installation Cost: 0,50 x Unlisted Equipment's PC

Figura 21. Diálogo de ajuste das opções de custos de investimento para a seção 'Perfusão'.

Uma vez definidos os parâmetros acima, pode-se verificar, através do sumário executivo do projeto (menu *View>Executive Summary*) os principais indicadores econômicos do projeto (Figura 22). Estes resultados serão discutidos no Capítulo IV.

6 O fator de custo para instalações (E) foi alterado de 0,45 para 0,90 para todas as seções, embora cada seção possa ter tais parâmetros ajustados independentemente.

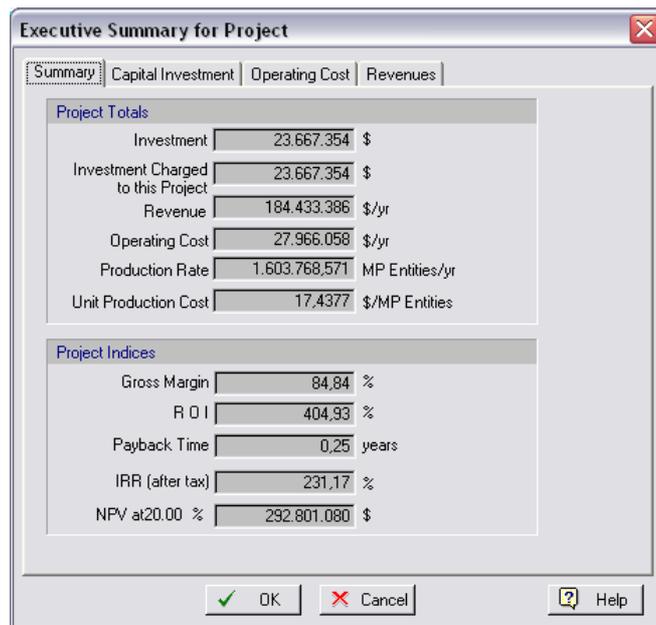


Figura 22. Sumário executivo do projeto com os principais indicadores econômicos.

IV. RESULTADOS

IV.1. Determinação da capacidade da planta

Para o dimensionamento da planta de produção de rFVIII, Silveira *et al.* (2005) realizaram uma análise de mercado com base nos dados da importação brasileira e na projeção da demanda brasileira de Fator VIII. Esta, por sua vez, baseou-se nos dados do Cadastro Nacional de Portadores de Coagulopatias Hereditárias e da projeção da população brasileira realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

No presente trabalho, embora as mesmas fontes de dados citadas acima tenham sido usadas, a metodologia para estimar a demanda foi alterada para levar em consideração os seguintes pontos:

- O programa brasileiro de coagulopatias hereditárias ainda não atende plenamente a população. Segundo a Federação Mundial de Hemofilia (*World Federation of Hemophilia* - WFH), o consumo anual típico de Fator VIII no tratamento de um adulto com hemofilia A grave seria de 218.000 UI para tratamento profilático, 60.000 a 100.000 UI para o tratamento sob demanda em países desenvolvidos, 40.000 UI para um tratamento de nível intermediário, e 15.000 a 20.000 UI seria o mínimo necessário (WFH, 1998). Portanto, a disponibilidade de Fator VIII deveria aumentar de 35.000 UI anuais por paciente para, pelo menos, 80.000 UI anuais por paciente.
- A prevalência da hemofilia A é tipicamente 1:10.000 homens. Com base nos dados do Cadastro Nacional, em 2010, a prevalência calculada é de 0,90 casos para cada 10.000 homens. Em 2007, a prevalência calculada era de 0,73 casos de hemofilia A para cada 10.000 homens. Este aumento está provavelmente relacionado ao fato de que, na década de 1980, ocorreram muitos óbitos de hemofílicos contaminados com os vírus da AIDS e da hepatite. Considerou-se, portanto, para o cálculo da demanda de rFVIII a prevalência de 1 caso de hemofilia A para cada 10.000 homens, conforme Pio *et al.* (2009).
- A Hemobrás terá condições, com a construção da nova fábrica em Pernambuco, de disponibilizar até 90 milhões de UI por ano de pdFVIII (CGEE, 2006), atendendo parcialmente a demanda brasileira.

Com base nestas premissas, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 8, que mostra a variação da demanda projetada de rFVIII entre 2010 e 2025.

Tabela 8. Projeção da demanda para produção de rFVIII.

Ano	População de homens	Número estimado de casos de hemofilia A	Demanda anual de concentrado de Fator VIII (10 ⁶ UI)	Demanda anual de rFVIII produzido (10 ⁶ UI) ⁽⁷⁾
2010	94.792.952	9.479	758,34	668,34
2011	95.577.195	9.558	764,62	674,62
2012	96.318.292	9.632	770,55	680,55
2013	97.021.248	9.702	776,17	686,17
2014	97.690.456	9.769	781,52	691,52
2015	98.330.018	9.833	786,64	696,64
2016	98.944.065	9.894	791,55	701,55
2017	99.535.649	9.954	796,29	706,29
2018	100.106.940	10.011	800,86	710,86
2019	100.659.174	10.066	805,27	715,27
2020	101.193.501	10.119	809,55	719,55
2021	101.710.492	10.171	813,68	723,68
2022	102.209.754	10.221	817,68	727,68
2023	102.690.218	10.269	821,52	731,52
2024	103.149.892	10.315	825,2	735,2
2025	103.586.664	10.359	828,69	738,69

Assim, uma planta para produção de Fator VIII recombinante deverá ter uma capacidade de pelo menos 740 milhões de UI anuais para atender a população brasileira.

Observe-se que a demanda, nos primeiros anos de operação da planta, seria cerca de 8% inferior a 740 milhões de UI. No entanto, há que se considerar que a oferta de pdFVIII pode variar de acordo com a quantidade de plasma de doadores disponível para fracionamento. Além disso, o excedente poderia ser exportado, tendo em vista a crise de abastecimento global para o rFVIII, mencionada por Garber (2000).

Para estimar o volume do biorreator principal (a partir do qual também foram estimados os volumes dos equipamentos de propagação), utilizou-se a seguinte fórmula (Chico *et al.*, 2008):

$$P_{acum} = V q_p \int X_v dt \quad (12)$$

⁷ Para o cálculo da demanda anual de rFVIII, a produção de pdFVIII pela Hemobrás foi subtraída da demanda anual total de concentrado de FVIII.

onde P_{acum} é a produção acumulada, V o volume útil do biorreator, q_p a taxa específica de formação de rFVIII, X_v a concentração celular no biorreator e t o tempo de operação.

X_v pode ser considerado constante, uma vez que varia apenas no início da operação do biorreator, mantendo-se as condições por 145 dias. A equação então pode ser reescrita como:

$$V = \frac{P_{acum}}{q_p X_v \Delta t} \quad (13)$$

onde Δt é a duração de uma batelada, cerca de um dia. A produção acumulada de uma batelada — considerando a atividade específica de rFVIII 7.000 UI mg⁻¹ ⁽⁸⁾, 290 bateladas por ano, 33 % de rendimento global, q_p igual a 1,00 pg cél⁻¹ dia⁻¹ e X_v igual a 2,0 x 10⁷ cél mL⁻¹ — seria de 1.104 mg de rFVIII, o que resultaria em um volume útil de aproximadamente 55 L, o qual foi dividido em dois biorreatores operando em paralelo, o que representa uma segurança adicional em caso de contaminação, conforme sugerido por Avery *et al.* (2003).

IV.2. Determinação dos parâmetros estequiométricos

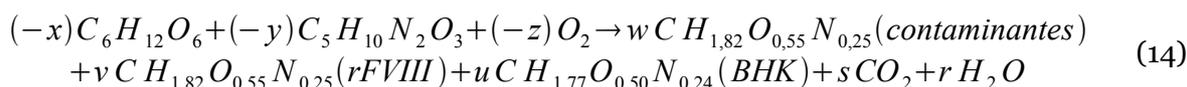
O cálculo dos parâmetros estequiométricos foi realizado em uma planilha auxiliar (Anexo 1), tendo como premissas:

- coeficiente de rendimento de células em relação ao substrato (glicose), $Y_{X/S}$, igual a 0,58 gBHK gGLC⁻¹ correspondente a uma média entre o valor descrito por Avery *et al.* (2003), 0,1 gBHK gGLC⁻¹, que resultou muito baixo e inviabilizou a simulação, e o valor máximo, 1,06 gBHK gGLC⁻¹, descrito por Hiller *et al.* (1991) *apud* Augusto *et al.* (2008);
- coeficiente de rendimento de produtos (proteínas totais, incluindo rFVIII e contaminantes) em relação a substrato (glicose), $Y_{P/S}$, igual a 0,22 gP gGLC⁻¹, calculado a partir do valor de 0,38 gP gBHK⁻¹ para o coeficiente de rendimento de produtos totais em relação a células, $Y_{P/X}$, obtido de Avery *et al.* (2003) (o valor de $Y_{P/S}$ é resultado da multiplicação de $Y_{P/X}$, por $Y_{X/S}$);

8 Média das faixas apresentadas em Wyeth (2010) e Baxter (2010), respectivamente, de 5.500 a 9.900 UI por mg de proteína para o *Xyntha*[®] e 4.000 a 10.000 UI por mg de proteína para o *Advate*[®].

- q_p igual a $1,00 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, adotado para a simulação base e considerando 1 dia um valor típico para o tempo de duplicação e, conseqüentemente, $\ln 2 \text{ dia}^{-1}$ para a taxa específica de crescimento celular (Chico *et al.*, 2008).

Com base nos valores acima, é possível obter um sistema de equações tendo como variáveis os coeficientes estequiométricos dos componentes envolvidos:



Na Equação 14, o sinal negativo se deve ao modo como foram calculados os coeficientes estequiométricos (x , y e z se referem aos reagentes e são valores negativos no sistema de equações). As fórmulas químicas para contaminantes, rFVIII e célula BHK, em base de 1 mol de carbono, são oriundas de Avery *et al.* (2003).

As premissas acima fornecem as seguintes equações:

$$\frac{0,58 \text{ g BHK}}{1 \text{ g GLC}} \times \frac{1 \text{ mol BHK}}{25,16 \text{ g BHK}} \times \frac{180,18 \text{ g GLC}}{1 \text{ mol GLC}} = \frac{u}{x} \quad (15 \text{ a})$$

$$\frac{0,22 \text{ g P}}{1 \text{ g GLC}} \times \frac{1 \text{ mol P}}{26,15 \text{ g P}} \times \frac{180,18 \text{ g GLC}}{1 \text{ mol GLC}} = \frac{(w+v)}{x} \quad (15 \text{ b})$$

$$\frac{10^{-12} \text{ g rFVIII}}{\text{cél dia}} \times \frac{1 \text{ mol rFVIII}}{26,15 \text{ g rFVIII}} \times \frac{25,16 \text{ g BHK}}{1 \text{ mol BHK}} \times \frac{1 \text{ cél}}{1,87 \times 10^{-9} \text{ g BHK}} \times \frac{1}{\ln 2 \text{ dia}^{-1}} = \frac{v}{u} \quad (15 \text{ c})$$

Na Equação 15 a, BHK se refere à formula química em base de um mol de carbono para a célula BHK. Na Equação 15 c, cél se refere a uma única célula BHK. O valor para a massa de uma célula BHK foi obtido a partir dos dados de Pinto *et al.* (2008), conforme Anexo 1, planilha 4.

As equações para os balanços de C, O, H e N são, respectivamente:

$$6x + 5y + w + v + u + s = 0 \quad (15 \text{ d})$$

$$6x + 3y + 2z + 0,55w + 0,55v + 0,5u + 2s + r = 0 \quad (15 \text{ e})$$

$$12x + 10y + 1,82w + 1,77u + 2r = 0 \quad (15 \text{ f})$$

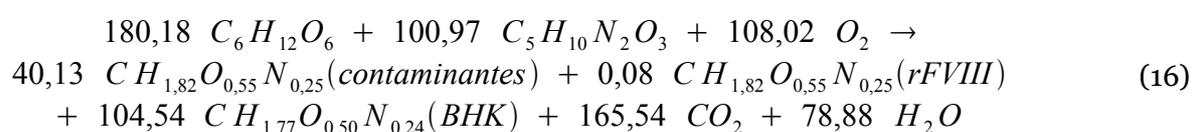
$$2y + 0,25w + 0,25v + 0,24u = 0 \quad (15 \text{ g})$$

Finalmente, a base adotada para o cálculo dos parâmetros estequiométricos é um mol de glicose consumido, que obriga:

$$x = -1 \quad (15 \text{ h})$$

O sistema de oito equações foi solucionado na forma matricial, conforme a planilha 5 do Anexo 1.

Note-se que os valores alimentados ao SPD foram os coeficientes estequiométricos mássicos, uma vez que o coeficiente estequiométrico molar para o rFVIII é inferior a 0,00.



IV.3. Resultados da simulação

Os principais resultados das simulações podem ser visualizados nos relatórios gerados pelo SPD, dentre os quais são aqui apresentados os obtidos para o projeto descrito no Capítulo III. Além destes resultados, foram construídas simulações para cenários alternativos para análises de sensibilidade para os principais parâmetros do processo, que serão apresentadas na seção IV.5.

A primeira tabela do relatório de materiais e correntes (*Materials & Streams Report*, Anexo 2) mostra a produção da planta e tempo de operação anual e por batelada, que no presente projeto é igual a um ciclo de purificação (Tabela 9).

Tabela 9. Dados globais do processo.

Tempo anual de operação	6.545,93 h
Produção anual	1.603.993,30 Entidades do PP ⁽⁹⁾
Produção por batelada	5.531,01 Entidades do PP ⁽⁶⁾
Duração de uma batelada	47,98 h
Duração de um ciclo	22,40 h
Número de bateladas por ano	290

9 Entidade do PP (produto principal) = Caixa contendo uma ampola de rFVIII na corrente “Produto”.

Da Tabela 9, verifica-se que a capacidade da planta projetada resultou em 802 milhões de UI de rFVII por ano, e não 740 milhões, como inicialmente estabelecido. Isto se deve ao fato de o modelo estequiométrico não levar em conta parâmetros cinéticos, particularmente a taxa específica de crescimento celular, de modo que a produção foi superestimada em cerca de 8 %.

Neste sentido, alguns ajustes podem ser sugeridos para compensar esta diferença (por exemplo, inserir uma taxa de falha de produto nos parâmetros econômicos do SPD, ou diminuir o rendimento global do processo). No entanto, como a diferença é relativamente pequena, tem pouco impacto na viabilidade econômica do projeto. Além disso, conforme discutido anteriormente, parte do excedente de produção poderia ser exportado.

Com relação à diferença entre a duração de um ciclo e a duração de uma batelada, observa-se que a duração de um ciclo, 22,4 h, é o tempo entre o início de duas bateladas consecutivas. Esta diferença pode ser melhor visualizada no gráfico de ocupação dos equipamentos (na forma de um diagrama de Gantt) gerado pelo SPD e mostrado na Figura 23.

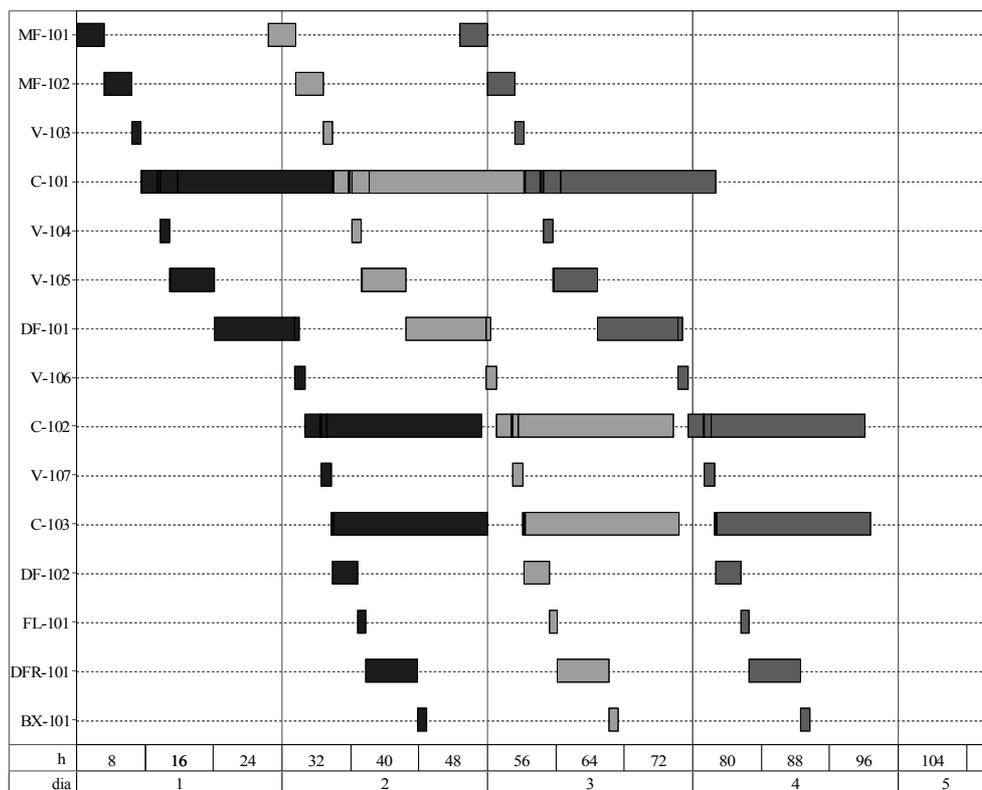


Figura 23. Gráfico de ocupação dos equipamentos. As barras indicam o início e o fim das operações em cada equipamento; cada batelada está representada em um tom de cinza.

No gráfico acima, os equipamentos estão representados pelas siglas, conforme mostradas no fluxograma do processo (Figura 2). Observa-se que a duração da batelada é dada pelo tempo decorrido entre o início da operação do primeiro módulo de microfiltração (MF-101) e o fim da última operação na coluna de troca aniônica (C-103). Note-se que as colunas cromatográficas estão ocupadas praticamente todo o tempo, devido às operações de sanitização e manutenção. Ainda, os demais equipamentos como V-101 (biorreator principal) e CY-101 (hidrociclone) não estão representados no diagrama de Gantt, pois operam em modo contínuo.

A duração da operação das colunas cromatográficas é o que limita a duração do ciclo a um mínimo de 22,4 h. O tempo de operação das colunas poderia ser diminuído alterando-se a duração das operações de limpeza e manutenção das colunas.

Outro relatório importante para a análise dos resultados é o de avaliação econômica (*Economic Evaluation Report*, Anexo 3). Além dos principais indicadores de viabilidade econômica, o relatório traz uma tabela com as especificações, capacidades, quantidades e custos dos equipamentos adotados (Tabela 10).

Tabela 10. Identificação, quantidade, capacidade e custos dos equipamentos adotados, apresentados na ordem em que aparecem no fluxograma do processo.

Nome	Especificações	Quantidade	Custo unitário (USD)
TTR-101	Banco de células (<i>Test Tube Rack</i>) Volume da ampola = 3 x 5 mL	1	0,00
SFR-101	Suporte para frasco agitado para propagação de células (<i>Shake Flask Rack</i>) Volume = 3 x 250 mL	1	0,00
SFR-102	Suporte para frasco agitado para propagação de células (<i>Shake Flask Rack</i>) Volume = 6 x 500 mL	1	0,00
SFR-103	Suporte para frasco agitado para propagação de células (<i>Shake Flask Rack</i>) Volume = 4 x 4.000 mL	1	0,00
V-101	Biorreator (<i>Fermentor</i>) Volume = 35 L	2	461.000,00
CY-101	Hidrociclone (<i>Hydrocyclone</i>) Vazão de alimentação = 35,87 L h ⁻¹	1	2.000,00
MF-101	Módulo de microfiltração (<i>Microfilter</i>) Área da membrana = 1,80 m ²	1	24.000,00

Tabela 10 (cont.).

Nome	Especificações	Quantidade	Custo unitário (USD)
MF-102	Módulo de microfiltração (<i>Microfilter</i>) Área da membrana = 1,80 m ²	1	24.000,00
V-102	Tanque de equalização (<i>Blending Tank</i>) Volume = 700 L	1	170.000,00
V-103	Tanque de equalização (<i>Blending Tank</i>) Vessel Volume = 350 L	1	154.000,00
C-101	Coluna de troca catiônica (<i>PBA Chromatography Column</i>) Volume = 13,21 L	1	130.000,00
V-104	Tanque de inativação viral (<i>Blending Tank</i>) Volume = 66,88 L	1	137.000,00
V-105	Tanque de inativação viral (<i>Blending Tank</i>) Volume = 66,86 L	1	137.000,00
DF-101	Módulo de diafiltração (<i>Diafilter</i>) Área da membrana = 0,10 m ²	1	26.000,00
V-106	Tanque de equalização (<i>Blending Tank</i>) Volume = 100 L	1	137.000,00
C-102	Coluna de imunoafinidade (<i>PBA Chromatography Column</i>) Volume = 0,38 L	1	150.000,00
V-107	Tanque de equalização (<i>Blending Tank</i>) Volume = 5 L	1	137.000,00
C-103	Coluna de troca aniônica (<i>PBA Chromatography Column</i>) Volume = 0,38 L	1	150.000,00
MX-101	Misturador de correntes (<i>Mixer</i>) Capacidade = 0,36 kg h ⁻¹	1	0,00
DF-102	Módulo de diafiltração (<i>Diafilter</i>) Área da membrana = 0,10 m ²	1	26.000,00
FL-101	Distribuidora (<i>Filler</i>) Capacidade = 2765,12 ampolas h ⁻¹	2	0,00
DFR-101	Liofilizador (<i>Discrete Freeze Dryer</i>) Capacidade de sublimação = 16,06 kg	1	139.000,00
BX-101	Empacotadora (<i>Packer</i>) Capacidade = 2765,12 caixas h ⁻¹	2	0,00
TOTAL			2465000

Na Tabela 10, os termos entre parênteses são os equipamentos tal como identificados pelo SPD. Note-se que alguns deles são considerados como de custo zero pelo *software*, o que não é realista, embora o principal custo seja oriundo de custos indiretos tais como o material consumido e custos de manutenção.

IV.4. Análise de viabilidade econômica

Como descrito na seção III.4, o investimento total é baseado principalmente no custo de aquisição dos equipamentos, sendo que demais custos diretos são calculados por fatores. O custo de aquisição de equipamentos consiste na soma dos custos unitários apresentados anteriormente, à qual se aplica um acréscimo de 20 % para incluir equipamentos auxiliares não listados. A Tabela 11 mostra o resumo dos custos de capital que compõem o investimento fixo direto.

Tabela 11. Resumo dos investimentos diretos e indiretos (valores em USD).

<i>Custo Direto Total da Planta (TPDC)</i>	
1. Aquisição de equipamentos	3.077.000,00
2. Instalação	938.000,00
3. Tubulações	1.077.000,00
4. Instrumentação	1.231.000,00
5. Isolamento	92.000,00
6. Elétrica	308.000,00
7. Edificações	2.769.000,00
8. Terreno	462.000,00
9. Instalações auxiliares	1.231.000,00
TPDC	11.184.000,00
<i>Custo Indireto Total da Planta (TPIC)</i>	
10. Engenharia	2.796.000,00
11. Construção	3.914.000,00
TPIC	6.710.000,00
<i>Custo Total da Planta (TPC = TPDC+TPIC)</i>	
TPC	17.894.000,00
<i>Empreiteira e Contingência (CFC)</i>	
12. Remuneração da empreiteira	895.000,00
13. Verba de contingência	1.789.000,00
CFC	2.684.000,00
<i>Investimento Fixo Direto (DFC = TPC+CFC)</i>	
DFC	20.579.000,00

Por sua vez, os custos de produção estão resumidos na Tabela 12, em que se verifica que os principais itens são o custo da matéria prima e o custo de mão de obra. Como se adotou neste projeto o padrão do SPD para estimativa de mão de obra, não há muita informação a ser analisada neste caso: o custo da hora do operador padrão é definido pelo SPD em USD 69,00, sendo necessários, segundo os cálculos do *software*, 149 homens-hora por ano para operação da planta.

Tabela 12. Resumo dos custos de produção.

Item	Custo (USD)	% do total
Matérias-primas	4.284.000,00	15,97
mão de obra	10.249.000,00	38,20
Custos operacionais fixos	3.847.000,00	14,34
Laboratório	5.124.000,00	19,10
Consumíveis	271.000,00	1,01
Tratamento de rejeitos	3.052.000,00	11,38
Utilidades	1.000,00	0,00
TOTAL	26.829.000,00	100,00

Por outro lado, o resumo dos custos anuais com matérias-primas e com consumíveis, apresentados nas Tabelas 13 e 14, mostram aqueles que têm maior impacto nos custos de produção.

Nota-se que os elementos que têm maior impacto nos custos de produção são: a membrana de microfiltração de 12", a membrana de diafiltração e a resina de imunoafinidade, por parte dos consumíveis; o material de embalagem, componentes da formulação final e o meio de cultura, por parte da matérias-primas.

Destes elementos, os que são, além disso, mais sensíveis do ponto de vista técnico são: o meio de cultura, pois uma mudança na formulação pode alterar completamente o comportamento do sistema de expressão; e a resina de imunoafinidade, por seu altíssimo custo decorrente do uso de mAb imobilizado.

Tabela 13. Resumo dos custos com matérias-primas.

Matéria-prima por massa	Custo (USD kg⁻¹)	Consumo anual (kg)	Custo anual (USD)	%
Meio de cultura	11,33	74.417	843.000,00	19,68
Ar	0,00	4.021	0,00	0,00
Tampão A	1,93	30.655	59.000,00	1,38
Tampão B	2,62	15.787	41.000,00	0,97
NaCl (2 M)	0,78	10.206	8.000,00	0,19
Tampão C	0,96	70.559	68.000,00	1,59
Histidina para cromatografia	487,71	4	2.000,00	0,05
Tampão D	17,32	511	9.000,00	0,21
Tampão E	8,30	1.022	8.000,00	0,20
Tampão F	3,97	307	1.000,00	0,03
Tampão G	2,15	307	1.000,00	0,02
Tampão H	1,90	307	1.000,00	0,01
TNBP	38,91	99	4.000,00	0,09
Triton X-100	192,60	290	56.000,00	1,30
Água	0,00	23.218	0,00	0,00
Sacarose	510,00	254	130.000,00	3,03
Cloreto de sódio	7,21	41	0,00	0,01
Glicine	460,00	525	242.000,00	5,64
Histidina	5.020,00	71	355.000,00	8,28
Cloreto de Cálcio	39,92	10	0,00	0,01
NaOH (0,1M)	0,08	30.172	2.000,00	0,05
NaOH (0,5 M)	0,38	126.545	48.000,00	1,12
NaOH (0,01 M)	0,01	8.105	0,00	0,00
Matéria-prima por unidade	Custo unitário (USD)	Consumo anual (unidades)	Custo anual (USD)	%
Ampolas	0,50	1.603.993	802.000,00	18,72
Caixa com agulha	1,00	1.603.993	1.604.000,00	37,44
TOTAL			4.284.000,00	100,00

Tabela 14. Resumo dos custos com consumíveis.

Consumíveis	Custo (USD unidade ⁻¹)	Consumo anual	Unidade	Custo anual (USD)	%
Criotubo 5 mL	0,50	6	item	3,00	0,00
Frasco agitado 250 mL	1,60	6	item	9,60	0,00
Frasco agitado 500 mL	1,70	12	item	20,40	0,00
Frasco agitado 4000 mL	2,00	8	item	16,00	0,01
Membrana de microfiltração 12"	196,27	522	m ²	102.000,00	37,82
Membrana de microfiltração 30"	255,28	131	m ²	33.000,00	12,30
Resina de troca catiônica	721,83	20	L	15.000,00	5,45
Resina de troca aniônica	917,81	1	L	1.000,00	0,22
Membrana de diafiltração 30 kDa	5.514,00	15	m ²	80.000,00	29,52
Resina de imunoafinidade	10.012,09	4	L	40.000,00	14,67
TOTAL				271.049,00	100,00

Finalmente, a Tabela 15 apresenta os principais indicadores econômicos do processo, os quais, junto com a projeção de fluxo de caixa (Tabela 16), obtida do respectivo relatório do SPD (*Cash Flow Analysis*, Anexo 4), completam a análise de viabilidade econômica do processo.

Os indicadores das Tabelas 15 e 16 demonstram que o projeto é muito vantajoso do ponto de vista econômico, demandando um investimento total bastante inferior (cerca de um terço) do total gasto atualmente por ano com importação do Fator VIII para o tratamento dos pacientes brasileiros, na modalidade de tratamento sob demanda.

A margem bruta e o retorno do investimento indicam que a receita é muito superior aos custos de produção. De fato, o fluxo de caixa mostra que a receita do primeiro ano é suficiente para pagar o investimento feito e cobrir os custos de produção do ano seguinte. Isto se reflete no tempo de retorno, que é bastante curto, diminuindo os riscos associados ao empreendimento.

Por sua vez, a taxa interna de retorno é mais de dez vezes superior à taxa mínima de atratividade, confirmando a viabilidade do projeto. Por incorporar variações da receita e dos custos ao longo do tempo e considerar a variação temporal do valor do dinheiro, este indicador é bastante adequado para as análises de sensibilidade, apresentadas na seção IV.5.

Como últimas observações sobre o fluxo de caixa apresentado, note-se que o valor positivo no investimento total, no último ano, refere-se ao valor residual dos equipamentos. Além disso, não se adotou nesta projeção um possível financiamento de parte do investimento no projeto, o que poderia torná-lo ainda mais vantajoso.

IV.5. Análises de sensibilidade

Como parte da análise dos resultados da simulação, foram realizadas análises de sensibilidade para avaliar a viabilidade do projeto dadas as possíveis variações em alguns dos parâmetros mais críticos do processo.

Um primeiro parâmetro que deve ser avaliado é o nível de produção, determinando-se o ponto de nivelamento, isto é, a produção mínima que deve ser vendida para que o projeto gere receitas que cubram os custos totais de produção, zerando os lucros (Silveira *et al.*, 2005). O gráfico a seguir (Figura 24) apresenta esta análise, gerada a partir da simulação de diversos cenários para a produção anual.

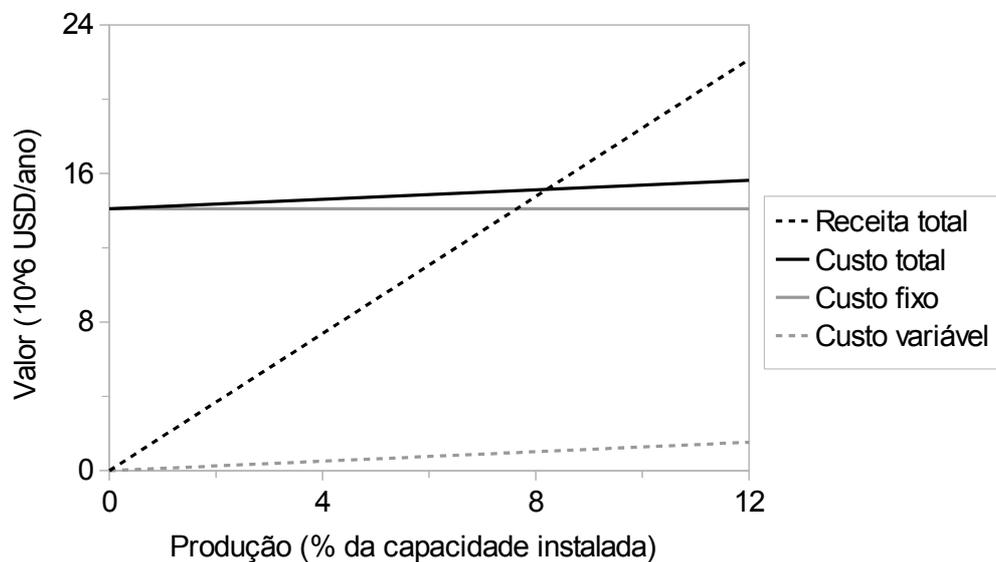


Figura 24. Gráfico do ponto de nivelamento.

Observa-se que o ponto de nivelamento ocorre quando a produção é aproximadamente 8,5 % da capacidade da planta, cerca 68 milhões de UI de rFVIII por ano. Este valor mostra uma margem de segurança muito alta em relação ao nível de utilização da capacidade da planta, uma outra vantagem do projeto.

A análise do ponto de nivelamento deve ser complementada com outra que mostre a relação entre o lucro e o preço de venda do produto, sendo o preço de referência, como mencionado anteriormente, de 0,23 USD UI⁻¹. O resultado desta análise é mostrado na Figura 25.

Verifica-se que é possível obter lucro com a venda do produto mesmo se o preço de mercado cair para cerca de 0,04 USD por UI de rFVIII, o que representa uma queda de 83 % em relação ao preço de venda de referência (marcado com a seta).

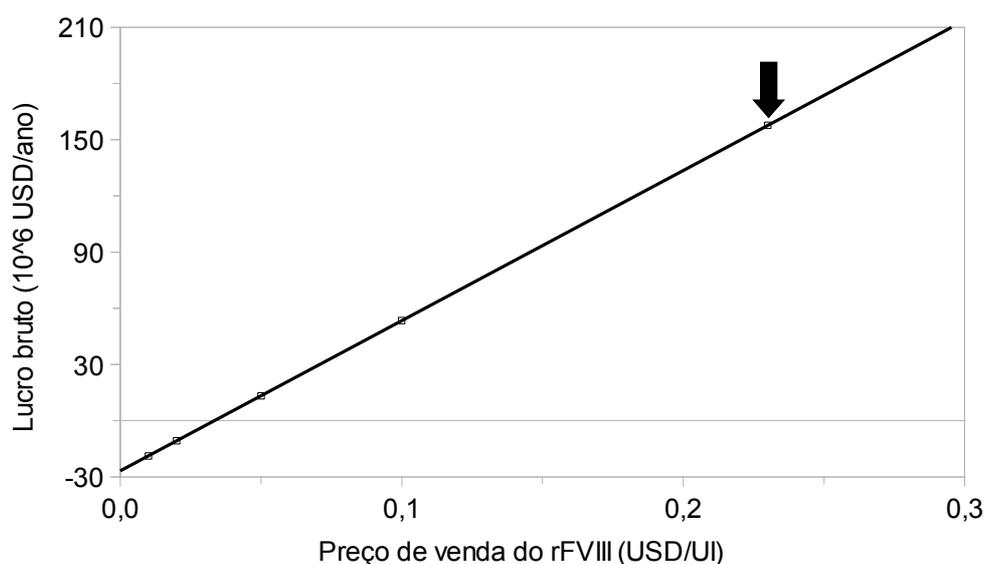


Figura 25. Relação entre lucro e preço de venda do produto.

Os resultados acima demonstram que o processo tal como descrito é bastante vantajoso do ponto de vista econômico. No entanto, a tecnologia envolvida neste projeto é sofisticada, de modo que se faz necessário avaliar a sensibilidade em relação a outros parâmetros críticos do processo, tais como a atividade específica do rFVIII, o custo do meio de cultura, o custo da resina de imunoafinidade e o nível de expressão de rFVIII pela linhagem celular utilizada.

As informações disponíveis sobre alguns dos medicamentos existentes no mercado mostram uma faixa em que pode variar a atividade específica do rFVIII, por exemplo, 4.000 a 10.000 UI por mg de proteína, no caso do *Advate*[®] (Baxter, 2010).

Portanto, realizaram-se quatro outras versões da simulação em que este valor foi variado, para verificar a viabilidade econômica caso a capacidade da planta precisasse ser aumentada ou diminuída para compensar tal alteração. Os resultados estão mostrados na Figura 26.

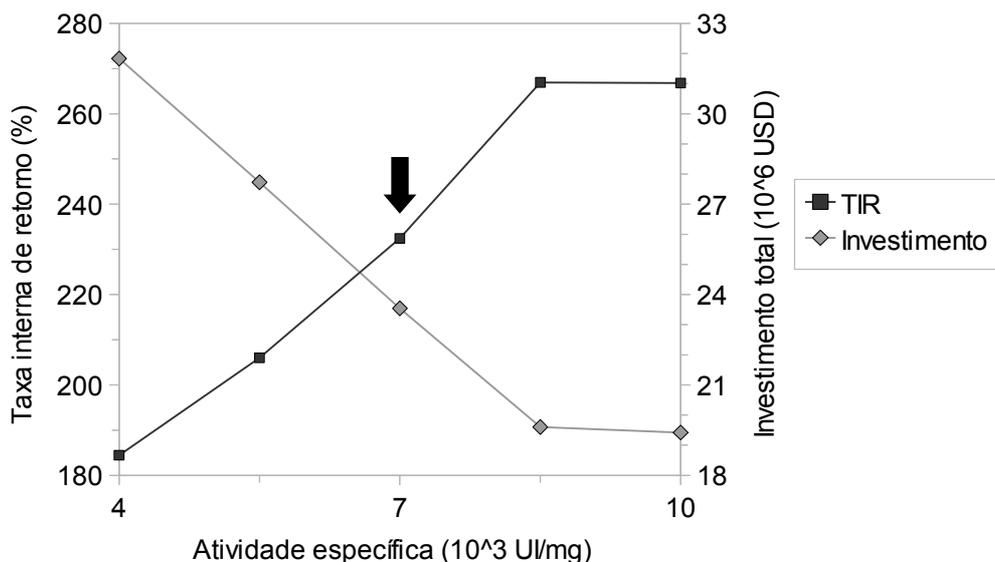


Figura 26. Análise de sensibilidade em relação à atividade específica do rFVIII.

Observa-se um aumento significativo da taxa interna de retorno conforme a atividade específica aumenta de 4.000 para até 8.500 UI por mg de rFVIII, acompanhado por uma redução proporcional no investimento total.

Entretanto, a partir de 8.500 UI mg⁻¹, a TIR não mais aumenta e os investimentos pouco diminuem. Isto se deve ao fato de que não há como reduzir significativamente a capacidade dos equipamentos e o consumo das matérias-primas. Além disso, observou-se que o modelo de custo de equipamentos do SPD não admite uma redução significativa no custo dos principais equipamentos.

Não obstante, verifica-se que, mesmo quando a atividade específica atinge o valor mínimo da faixa analisada, o projeto ainda é viável, com investimento total de cerca de USD 32 milhões e TIR de 186 %.

O valor adotado para o preço do meio de cultura livre de soro é 20 BRL L⁻¹, preço cotado em maio de 2010 junto ao fornecedor para aquisição em grande escala do meio *EX-CELL*[®] 325 da Sigma-Aldrich, fornecido em pó. Os resultados da análise de sensibilidade para uma variação de -50 % a 200 % no preço de referência (10 a 60 BRL L⁻¹) são mostrados no gráfico da Figura 27.

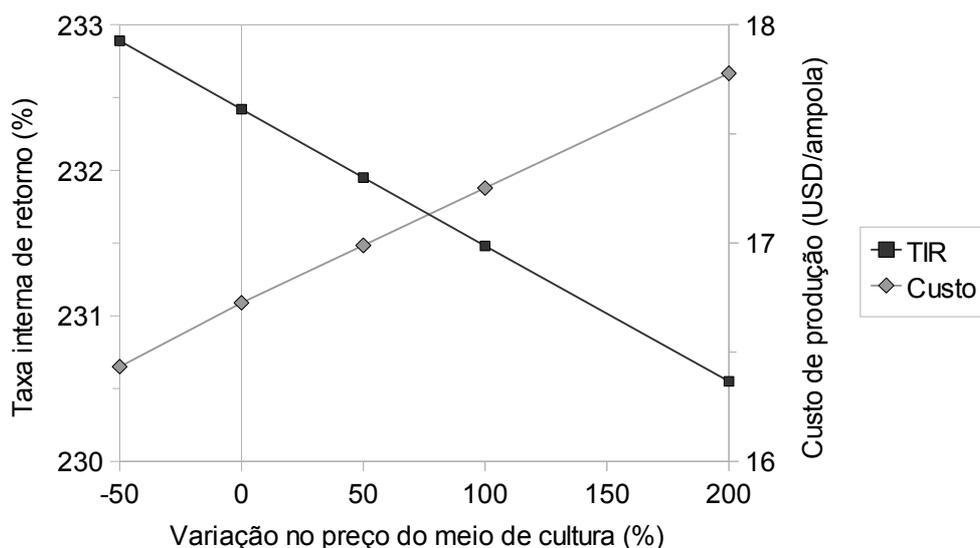


Figura 27. Análise de sensibilidade em relação ao preço do meio de cultura.

Verifica-se que o custo de produção é pouco sensível a variações no preço do meio de cultura, embora seja utilizado em grandes quantidades (75.000 kg por ano). Isto é favorável ao projeto, pois uma vez definido o meio de cultura a ser adotado, sua composição não poderá sofrer nenhuma alteração, sob o risco de ter menor expressão ou estabilidade do rFVIII produzido, além de ter que validar novamente o processo e, possivelmente, acarretar exigência de novos testes pelas agências regulatórias.

O gráfico a seguir (Figura 28) mostra o resultado da análise de sensibilidade para o custo da resina de imunoafinidade para uma variação de -50 % a 200 % no preço de referência. O preço de referência, por volume de resina, foi calculado em 10.012,09 USD L⁻¹, com base nos dados de Silveira *et. al.* (2005), isto é, USD 3.000,00 por grama de anticorpo anti-FVIII e USD 17,41 por grama de resina. Portanto, a faixa avaliada variou entre 5.006,05 USD L⁻¹ e 30.036,27 USD L⁻¹.

Os resultados mostram que o custo da resina de imunoafinidade tem influência ainda menor sobre o custo de produção do que a variação no preço do meio de cultura. Ocorre que, dada a atividade específica relativamente alta do rFVIII, um volume de resina muito pequeno é necessário para a purificação. Caso o valor adotado para a atividade específica fosse menor do que a adotada (7.000 UI por mg de proteína), seria de se esperar que o preço da resina de imunoafinidade tivesse um impacto maior sobre o custo de produção.

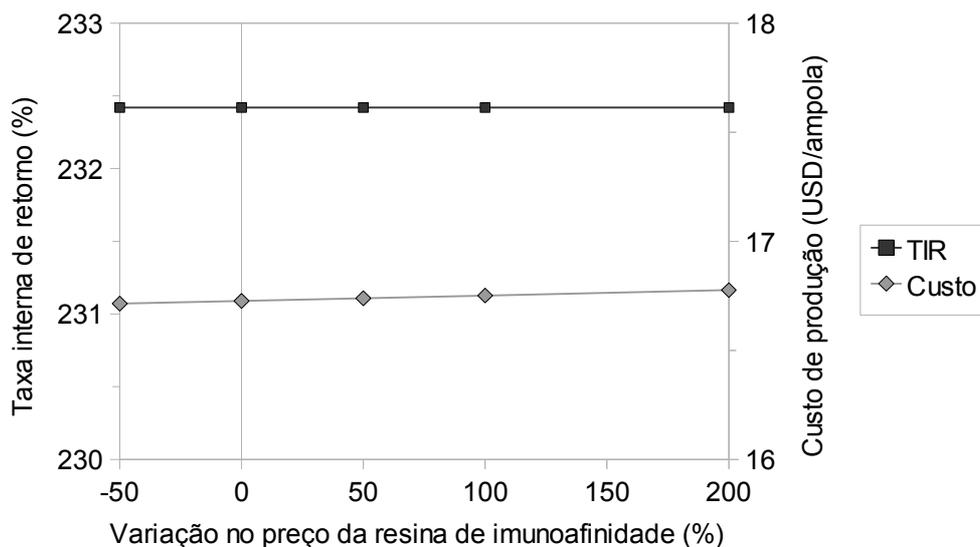


Figura 28. Análise de sensibilidade em relação ao preço da resina de imunoafinidade.

Finalmente, procedeu-se a uma análise de sensibilidade em relação ao nível de expressão da linhagem celular utilizada. Neste caso, também foi necessário simular cenários alternativos para cada valor. Como limites mínimo e máximo adotou-se, respetivamente, $0,1 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e $10 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e valores intermediários de $0,5$ e $5 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Como referência, nota-se que Avery *et al.* (2003) adotaram um valor calculado em $1,72 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e Chico *et al.* (2008) relatam valores de 1 a $30 \text{ pg cél}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para expressões estáveis.

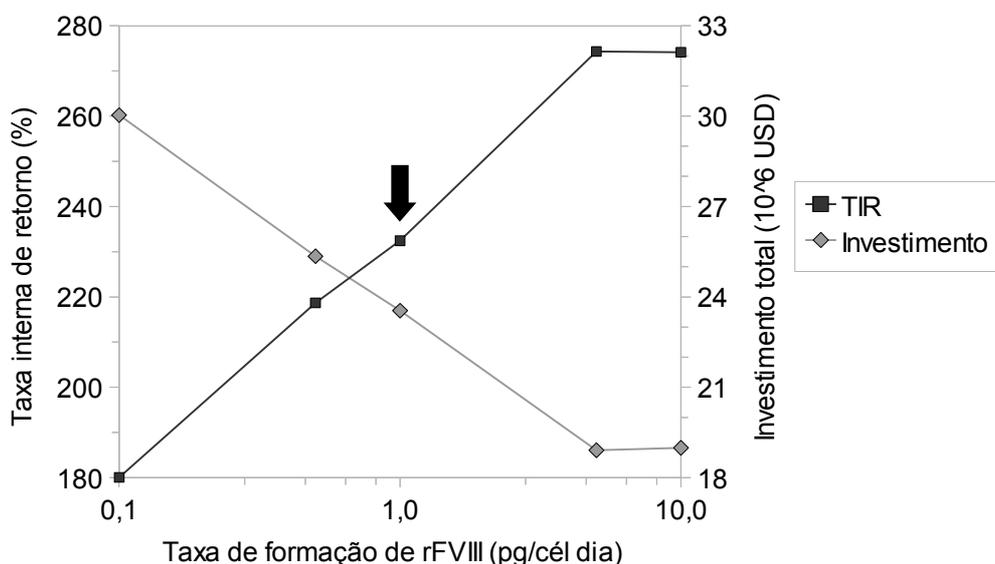


Figura 29. Análise de sensibilidade em relação ao nível de expressão.

Com relação à análise de sensibilidade para o nível de expressão, verifica-se que este é um fator mais crítico para o processo do que qualquer dos outros analisados. A redução na

expressão de rFVIII implica em drástico aumento na capacidade dos principais equipamentos, aumentando o investimento necessário e os custos de produção.

Por outro lado, se o cenário for de aumento na expressão de rFVIII, são reduzidos os investimentos e os custos, embora não se verifique uma grande vantagem do ponto de vista econômico no aumento da expressão de rFVIII de 5 para 10 pg cél⁻¹ dia⁻¹.

Da mesma forma que na análise de sensibilidade para a atividade específica, a redução na capacidade dos principais equipamentos não foi acompanhada por uma redução proporcional do custo, segundo o modelo do SPD. Por exemplo, o biorreator principal no cenário de 10 pg cél⁻¹ dia⁻¹, que tem um volume total de cerca de um quinto do volume do biorreator principal no cenário de referência, é considerado como tendo o mesmo custo de aquisição, como se o modelo de custo de equipamentos do SPD não admitisse valor menor que o mínimo de USD 461.000,00.

No entanto, não foram feitas, na simulação destes cenários, alterações mais significativas no processo proposto para a situação de 1 pg cél⁻¹ dia⁻¹ (marcada pela seta). Neste sentido, algumas etapas do processo poderiam ser alteradas para se obter maior economia, tendo em vista a maior concentração da proteína de interesse no fluido de processo, isto é, poder-se-ia admitir um rendimento global menor, empregando-se equipamentos de purificação tecnicamente menos eficientes, mas também menos caros.

De qualquer forma, verifica-se que, mesmo quando a expressão de rFVIII é reduzida a 10 % do valor de referência, o processo continua sendo economicamente viável, apresentando uma taxa interna de retorno de cerca de 180 %. Portanto, as análises de sensibilidade vêm confirmar a viabilidade e as vantagens deste empreendimento.

V. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

No presente projeto, utilizou-se uma ferramenta computacional com o objetivo de facilitar a análise de diversos cenários de maneira mais detalhada. Embora tenha algumas limitações, o *SuperPro Designer*[®] é adequado para realizar uma avaliação preliminar de alternativas e revelar os pontos economicamente mais sensíveis do processo proposto. Dentre tais limitações podem ser citadas impossibilidade de o usuário implementar seus próprios modelos nos casos em que os disponíveis no *software* se mostram inadequados e o fato de seus modelos para preços de equipamentos subestimarem os valores esperados para um projeto desta natureza.

Ainda assim, o presente projeto não esgotou de forma alguma as possibilidades oferecidas pelo programa. Neste sentido, é possível, através do estudo das condições do processo por métodos experimentais ou mesmo pelo conhecimento de processos similares, obter dados, a serem alimentados ao *software*, que confirmam maior grau de certeza aos resultados apresentados acima.

O conjunto de simulações realizadas no presente trabalho forneceu resultados muito positivos em relação à implantação de uma planta de FVIII recombinante no Brasil. O investimento foi estimado em 23,5 milhões de dólares para uma capacidade de 800 milhões de UI de rFVIII por ano, oferecendo lucro líquido anual de 96,5 milhões de dólares e taxa interna de retorno de 232 %.

As análises de sensibilidade mostraram que variações significativas nos parâmetros mais críticos do processo não o inviabilizariam: o ponto de nivelamento ocorre quando o nível de produção é de 68 milhões de UI por ano, o preço de venda poderia ser tão baixo quanto 0,04 USD UI⁻¹ e os piores cenários (nível de expressão do FVIII pela linhagem celular utilizada de 0,01 pg cél⁻¹ dia⁻¹ e atividade específica do rFVIII de 4.000 UI mg⁻¹) apresentam TIR de cerca de 180 %.

Além disso, diante da inegável viabilidade e atratividade observada nos resultados apresentados neste projeto, caberiam ainda outras análises, que levassem em conta, por exemplo, investimentos em P&D anteriores à implementação do projeto, para o aperfeiçoamento da tecnologia a ser empregada, ou pagamentos de *royalties* devidos à transferência de tecnologia.

Tais resultados, mesmo que obtidos por uma metodologia que fornece um nível de detalhamento de projeto ainda baixo, demonstram claramente a necessidade de se implementar no País tecnologias de produção de biofármacos recombinantes.

Além do retorno econômico, seria beneficiado todo o complexo industrial da saúde no Brasil, com capacitação de mão de obra altamente especializada e acúmulo de conhecimento técnico. Cabe acrescentar que o maior benefício, imensurável, seria para os pacientes hemofílicos, que poderiam, assim, contar com a disponibilidade de medicamento ideal para o tratamento profilático melhorando muito sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, P. M. M., CARRONDO, M. J. T., CRUZ, P. E. (2008). Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica, 1-14, Roca, São Paulo.
- AMABLE, P. (2008). Desenvolvimento de um processo de produção de fator VIII da coagulação sanguínea humano recombinante, Projeto de Tese de Doutorado, Programa de Ciências Morfológicas, UFRJ, Rio de Janeiro.
- AMORIM FILHO, L. M. (2010). Informação pessoal.
- ARRIGHI, S., BORRI, M. G., CECCARINI, C. (1993). Process for the purification of Factor VIII and Factor VIII obtained by said process, Patente nº US 5259951.
- AUGUSTO, E. F. P., BARRAL, M. F., PICCOLI, R. A. M. (2008). Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica, 170-215, Roca, São Paulo.
- AVERY, M., PLZAK, K., GASS, J. (2003). The Production of Recombinant Factor VIII - Process Design Project - Final Report, disponível em <http://www.mavery.com/academic/Factor_VIII_Production.pdf>, acessado em 09.nov.2009.
- BAXTER Healthcare Corporation (2010). *Advate*® Prescribing Information, disponível em <http://www.advate.com/pdf/advate_pi.pdf>, acessado em 21.set.2010.
- BCB - Banco Central do Brasil (2010). Histórico de Metas para a Inflação no Brasil, disponível em <<http://www.bcb.gov.br/Pec/metas/TabelaMetaseResultados.pdf>>, acessado em 18.ago.2010.
- BHATTACHARYYA, M. S., SINGH, J., SONI, P., U.C. BANERJEE, U. C. (2003). Recombinant Factor VIII for Haemophilia: An Overview of Production Technologies, CRIPS 4 (3), 2-8.

- BÖDEKER, B. (2006). Rekombinante Faktoren der Blutgerinnung. *Pharm. Unserer Zeit*, 35, 40-45.
- BOEDEKER, B. G. D. (1992). The Manufacturing of The Recombinant Factor VIII, Kogenate, *Transfusion Medicine Reviews*, VI (4), 256-260.
- BUTLER, M. (2008). Modificações pós-tradução em proteínas recombinantes. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 122-137, Roca, São Paulo.
- CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2006). Hemoderivados, disponível em <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tro7_hemoderivados.pdf>, acessado em 17.out.2010.
- CGSH - Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde (2010). Informação pessoal.
- CHAN, S.-Y., HARRIS, K. (2001). Preparation of recombinant Factor VIII in a protein free medium, Patente nº US 6171825 B1.
- CHAUVEL, A., FOURNIER, G., RAIMBAULT, C. (2003). *Manual of Process Economic Evaluation*, Editions Technip, Paris.
- CHICO, E., RODRÍGUEZ, G., FIGUEREDO, A. (2008). Biorreatores para células animais. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 216-254, Roca, São Paulo.
- DOUGLAS, J. M. (1988). *Conceptual Design of Chemical Processes*, McGraw-Hill, New York.
- EMA - European Medicines Agency (2005). European Public Assessment Report, *octocog a lfa*, disponível em <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp>, acessado em 10.jul.2010.
- FARID, S. S., WASHBROOK, J., TITCHENER-HOOKER, N. J. (2006). Modelling biopharmaceutical manufacture: Design and implementation of SimBiopharma, *Computers & Chemical Engineering*, 31, 1141-1158.

- FDA - US Food and Drug Administration (2010). Fractionated Plasma Products > February 21, 2008 Approval Letter - XYNTHA, disponível em <<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm124745.htm>>, acessado em 05.dez.2010.
- FERREIRA, J. S. G., CASTILHO, L. R., PAIVA, S. P. (1995). Produção de Pectinases para a Indústria de Bebidas, Projeto Final de Curso, Leite, S. G. F. e Pessoa, F. L. P. (orientadores), UFRJ/EQ Rio de Janeiro.
- GARBER, K. (2000). rFactor VIII deficit questioned, *Nature Biotechnology*, 18, 1133.
- GOMPERTS, E., LUNDBLAD, R., ADAMSON, R. (1992). The Manufacturing Process of Recombinant Factor VIII, Recombinate, *Transfusion Medicine Reviews*, VI (4), 247-251.
- GOSLING, I. (2003). Process Simulation and Modeling Strategies for the Biotechnology Industry, disponível em <<http://www.chemsim.com/GENArticleSept03pdfprep.pdf>>, acessado em 06.jun.2010.
- HEIDEMANN, R., MERED, M., MICHAELS, J. D., KONSTANTINOV, K. (2005). Device and method for seed-train expansion of mammalian cells, Patente nº US 6953692B2.
- HILLER, G. W., AESCHLIMANN, A.D., CLARK, D.S. *et al.* (1991). A kinetic analysis of hibridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 733-741 (*apud* Augusto *et al.*, 2008).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010). Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008, disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/default.shtm>, acessado em 26.mai.2010.
- INTELLIGEN, Inc. (2005). SuperPro Designer® User's Guide.
- KELLEY, B. D., VUNNUM, S., DALBORG, J., PETERSSON, A. (2004), Method for producing Factor VIII proteins, Publicação de pedido de patente nº US 2004/0087776 A1.

- KELLEY, B., JANKOWSKI, M., BOOTH, J. (2010). An improved manufacturing process for Xyntha/ReFacto AF, *Haemophilia*, 16 (5), 717-725.
- MAZIN, A. P. R. e DE ANDRÉA, T. V. (2010). Estudo de viabilidade econômica de produção de glucoamilase por fermentação no estado sólido a partir de rejeito agroindustrial, Projeto Final de Curso, Castro, A. M. e Salgado, A. M. (orientadoras), UFRJ/EQ, Rio de Janeiro.
- MELLADO, M. C. M. e CASTILHO, L. R. (2008). Proteínas recombinantes terapêuticas. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 383-402, Roca, São Paulo.
- MORAES, A. M., MENDONÇA, R. Z., SUAZO, C. A. T. (2008). Meios de cultura para células animais. Em: Moraes, A. M., Augusto, E. F. P, Castilho, L. R. (eds.), *Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica*, 105-121, Roca, São Paulo.
- MS - Ministério da Saúde (2006). Manual de Tratamento das Coagulopatias Hereditárias, disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/06_1132_M.pdf>, acessado em 18.jul.2010.
- MS - Ministério da Saúde (2008). Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2007, disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf>, acessado em 15.jul.2010.
- MS - Ministério da Saúde (2010). Portal da Saúde. Hemobrás nacionaliza quatro hemoderivados, disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/hemobras/visualizar_texto.cfm?idtxt=34147&janela=1>, acessado em 25.mai.2010.
- NIELSEN, J., VILLADSEN, J., LIDÉN, G. (2003). *Bioreaction Engineering Principles*, 2ª ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- PETERS, M. S., TIMMERHAUS, K. D., WEST, R. G. (2004). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, McGraw-Hill, New York.
- PETRIDES, D. (2000). *Bioprocess Design and Economics*, disponível em <<http://www.intelligen.com/downloads/BookChpInPdf.zip>>, acessado em 15.abr.2010.

- PINTO, R. C. V., MEDRONHO, R. A., CASTILHO, L. R. (2008). Separation of CHO cells using hydrocyclones, *Cytotechnology* (Dordrecht), 56, 57-67.
- PIO, S. F., OLIVEIRA, G. C., REZENDE, S. M. (2009). As bases moleculares da hemofilia A, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 55(2), 213-219.
- RIPPNER, B., ÖSTERBERG, J., NILSSON, U., IVARSSON, E., AGERKVIST, I. (2010). New protecting compositions for recombinantly produced Factor VIII, Publicação de pedido de patente internacional nº WO 2010/026186 A1.
- ROUF, S. A., DOUGLAS, P. L., MOO-YOUNG, M., SCHARER, J. M. (2001). Computer simulation for large scale bioprocess design, *Biochemical Engineering Journal*, 8(3), 229-234.
- SANDBERG, H., STENLUND, P., SCHRÖDER, C., CASADEMUNT, E., TIEMEYER, M. (2010). Recombinantly produced human Factor VIII and IX, Publicação de pedido de patente internacional nº WO 2010/020690 A1.
- SHANKLIN, T., ROPER, K., YEGNESWARAN, P. K., MARTEN, M. R. (2001). Selection of bioprocess simulation software for industrial applications, *Biotechnology and Bioengineering*, 72(4), 483-489.
- SILVEIRA, C. R., PETROCÍNIO, F. R. M., BRAGA, J. S. (2005). Projeto de uma planta para a produção de Fator VIII recombinante, Projeto Final de Curso, Medronho, R. A. e Castilho, L. R. (orientadores), UFRJ/EQ, Rio de Janeiro.
- SMEDS, A.-L. (1999). Process for purification of Factor VIII, Patente nº US 6005082.
- TOUMI, A., JÜRGENS, C., JUNGO, C., MAIER, B. A., PAPAVALASILEIOU, V., PETRIDES, D. P. (2010). Design and Optimization of a Large Scale Biopharmaceutical Facility Using Process Simulation and Scheduling Tools, *Pharmaceutical Engineering*, 30 (2), 1-9.
- WALSH, G. (2003). *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, 2ª ed., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.

WFH - World Federation of Hemophilia (1998). Key Issues in Hemophilia Treatment, Facts and Figures, No. 1, disponível em <http://www.wfh.org/2/docs/Publications/Treatment_Products/Monographs/FF1_Part1_Products_ENG.pdf>, acessado em 25.mai.2010.

WYETH Pharmaceuticals Inc. (2008). *Xyntha*[®] Prescribing Information, disponível em <<http://www.pfizerpro.com/content/showlabeling.asp?id=496>>, acessado em 21.set.2010.

ANEXOS

Anexo 1. Tabelas de apoio construídas no *BrOffice.org Calc 3.1*

Planilha 1. Componentes puros

Planilha 2. Consumíveis

Planilha 3. Misturas

Planilha 4. Dados auxiliares

Planilha 5. Estequiometria

Anexo 2. Relatório de materiais e correntes do SPD

Anexo 3. Relatório de avaliação econômica do SPD

Anexo 4. Relatório de análise de fluxo de caixa do SPD

1.Componentes puros

ID			Propriedades					Dados Econômicos	
Nome (Company ID)	Fórmula	CAS No.	MM (g/gmol)	PF (°C)	PE (°C)	outras propriedades	Tam. part. (µm)	Preço (USD/kg)	Fonte
Oxigênio	O2	7782-44-7	32	-218,79	-182,84	DB	0	0,000000	
Nitrogênio	N2	7727-37-0	28,02	-210	-195,76	DB	0	0,000000	
Água	H2O	7732-18-5	18,02	0	100	DB	0	0,000000	
WFI	H2O	WFI	18,02	0	100	DB	0	0,027450	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Gás Carbônico	CO2	124-38-9	44,01	-56,57	-78	DB	0	0,000000	
Meio de Cultura	Meio	Meio	18,02	0	100	Water	0	11,328000	Sigma-Aldrich
Glicose	C6H12O6	50-99-7	180,18	146	343,85	DB	0	0,000000	
Glutamina	C5H10N2O3	56-85-9	146,17	236,25	425,85	Glycine	0	0,000000	
Célula BHK	CH1.77O0.50N0.24	CRL 8544	25,16	-273,15	526,85	Biomass	15	0,000000	
Cloreto de Sódio	NaCl	7647-14-5	58,45	800,8	1464,85	DB	0	7,210000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
EDTA	Na2C10H14O8N2	EDTA Disodium	336,21	-273,15	1226,85	DB	0	146,530000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Octoxynol 9	C33H60O10.5	9002-93-1	624	-273,15	1226,85	EDTA Disodium	0	211,967000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Acetato de Amônio	C2H7NO2	631-61-8	77,08	800,8	1464,85	Sodium Chloride	0	40,480000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Cloreto de Cálcio	CaCl2	10043-52-4	110,98	771,85	1935,45	DB	0	39,920000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Sorbitol	C6H14O6	50-70-4	182,17	91,5	430,85	DB	0	9,660000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Hidróxido de Sódio	NaOH	1310-73-2	40,01	322,85	1556,85	DB	0	19,300000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
TNBP	C12H27O4P	126-73-8	266,32	-80	289	EDTA Disodium	0	38,908000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Triton X-100	C33H60O10.5	9002-93-1	624	-273,15	1226,85	EDTA Disodium	0	192,600000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Histidina	C6H9N3O2	71-00-1	155,14	236,25	425,85	Glycine	0	5020,000000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Histidina para cromatografia	C6H9N3O2	71-00-1	155,14	236,25	425,85	Glycine	0	487,710000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Etilenoglicol	HOCH2CH2OH	107-21-1	62,07	-13	197,55	DB	0	23,900404	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Fosfato de Sódio Monobásico	NaH2PO4	NaH2PO4	119,97	-273,15	1226,85	DB	0	108,950000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Fosfato de Sódio Dibásico	Na2HPO4	N/A, 298	141,95	-273,15	100,05	DB	0	74,430000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Sacarose	C12H22O11	57-50-1	342,3	186	477,85	DB	0	510,000000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
Glicina	C2H5NO2	56-40-6	75,07	236,25	425,85	DB	0	460,000000	Silveira <i>et al.</i> (2005)
rFVIII	CH1.82O0.55N0.25	rFVIII	26,15	-273,15	100,05	Proteins	0	0,000000	
rFVIII inativo	CH1.82O0.55N0.25	rFVIII	26,15	-273,15	100,05	Proteins	0	0,000000	
Contaminante	CH1.82O0.55N0.25	Contaminante	26,15	-273,15	100,05	Proteins	0	0,000000	
Imidazol	C3H4N2	288-32-4	68,08	90	256	Pyrazole	0	340,000000	Sigma-Aldrich
Embalagem	Embalagem	Embalagem	18,02	0	100	Water	0	0,000000	

2. Consumíveis

Nome	Preço (USD/unidade)	Unidade	Vida útil
Membrana de microfiltração 12"	196,27	m ²	1 ciclo
Membrana de microfiltração 30"	255,28	m ²	4 ciclos
Membrana de microfiltração 10"	765,83	m ²	4 ciclos
Membrana de diafiltração 30kDa	5.514,00	m ²	4 ciclos
Resina de troca catiônica	721,83	L	150 ciclos
Resina de troca aniônica	917,81	L	150 ciclos
Resina de imunoafinidade	10.012,09	L	25 ciclos

Fonte: Silveira *et al.* (2005).

3.Misturas

Misturas / Componentes	Concentração	Fração Mássica
Ar (Air)		
Oxigênio		23,2882
Nitrogênio		76,7118
Meio		
Meio de Cultura		70,1612
Glicose		14,9194
Glutamina		14,9194
Tampão A		
Histidina para cromatografia	25 mM	0,3830
Cloreto de Sódio	150 mM	0,8658
Água	solvente	98,7512
Tampão B		
Cloreto de Sódio	0,8 M	4,6760
EDTA	3 mM	0,1009
Octoxynol 9	0,02 %(v/v)	0,0214
Acetato de Amônio	0,1 M	0,7708
Cloreto de Cálcio	5 mM	0,0555
Sorbitol	1 M	18,2170
Água	solvente	76,1584
Tampão C		
Imidazol	25 mM	0,1605
Cloreto de Sódio	1 M	5,5105
Cloreto de Cálcio	5 mM	0,0523
Água	solvente	94,2767
NaCl (2 M)		
Cloreto de Sódio	2 M	10,8700
Água	solvente	89,1300
NaOH (0.5 M)		
Hidróxido de Sódio	0,5 M	1,9600
Água	solvente	98,0400
NaOH (0.1M)		
Hidróxido de Sódio	0,1 M	0,4001
Água	solvente	99,5999
Tampão D		
Histidina para cromatografia	0,05 M	0,7757
Cloreto de Cálcio	0,05 M	0,5549
Etilenoglicol	50 %(v/v)	55,5000
Octoxynol 9	0,02 %(v/v)	0,0214
Água	solvente	43,1480
Octoxynol 9 (0.02%)		
Octoxynol 9	0,02 %(v/v)	0,0214
Água	solvente	99,9786
NaOH (0.01 M)		
Hidróxido de Sódio	0,01 M	0,0400
Água	solvente	99,9600
Tampão E		
Histidina para cromatografia	0,05 M	0,7507
Cloreto de Cálcio	0,05 M	0,5369
Octoxynol 9	0,02 %(v/v)	0,0209
Cloreto de Sódio	15 mM	0,0841
Etilenoglicol	17 %(v/v)	18,3086
Água	solvente	80,2988
Tampão F		
Histidina para cromatografia	0,05 M	0,7757
Cloreto de Cálcio	4 mM	0,0444
Cloreto de Sódio	0,4 M	2,3380
Água	solvente	96,8419
Tampão G		
Cloreto de Sódio	2 M	11,6900
Fosfato de Sódio Monobásico	0,1 M	1,1997
Água	solvente	87,1103
Tampão H		
Cloreto de Sódio	2 M	11,6900
Fosfato de Sódio Dibásico	0,1 M	1,4195
Água	solvente	86,8905

4.Dados auxiliares

Dados			Fonte
densidade da célula	1060	kg m ⁻³	Pinto <i>et al.</i> (2008)
diâmetro da célula	15	µm	Pinto <i>et al.</i> (2008)
massa da célula	1,87E-009	g	
atividade específica do rFVIII	7000	UI mg ⁻¹	Wyeth (2010) e Baxter (2010)
densidade celular no biorreator	2,00E+007	célula mL ⁻¹	Heidemann <i>et al.</i> (2005)
densidade celular no biorreator	3,75E+001	gcél L ⁻¹	
densidade celular inicial	2,00E+005	célula mL ⁻¹	Silveira <i>et al.</i> (2005)
densidade celular inicial	3,75E-001	gcél L ⁻¹	
densidade celular final na propagação de inóculo	1,00E+006	célula mL ⁻¹	Silveira <i>et al.</i> (2005)
densidade celular final na propagação de inóculo	1,87E+000	gcél L ⁻¹	
coeficiente de rendimento para células em relação a substrato	0,1	gcél gGLC ⁻¹	Avery <i>et al.</i> (2003)
coeficiente de rendimento para produtos em relação a células	0,38	gP gcél ⁻¹	Avery <i>et al.</i> (2003)
coef. de rendimento máximo para células em relação a substr.	1,02E+008	cél mmolGLC ⁻¹	Hiller <i>et al.</i> (1991) <i>apud</i> Augusto <i>et al.</i> (2008)
coef. de rendimento máximo para células em relação a substr.	1,06E+000	gcél gGLC ⁻¹	
coef. de rendimento médio para células em relação a substrato	5,80E-001	gcél gGLC ⁻¹	
taxa específica de formação de rFVIII	1,72E+000	pg cél ⁻¹ dia ⁻¹	calculado a partir de Avery <i>et al.</i> (2003)
taxa específica de crescimento celular	0,69	dia ⁻¹	Chico <i>et al.</i> (2008)

5.Estequiometria

Premissas:

$Y_{x/S}$ 0,58 gcél gGLC⁻¹

$Y_{p/S}$ (total) 0,22 gP gGLC⁻¹

q_p (rFVIII) 1,00 pg cél⁻¹ dia⁻¹

	A							X	B	
balanço de C	6	5	0	1	1	1	1	0	x	0
balanço de O	6	3	2	0,55	0,55	0,5	2	1	y	0
balanço de H	12	10	0	1,82	1,82	1,77	0	2	z	0
balanço de N	0	2	0	0,25	0,25	0,24	0	0	w	0
$Y_{x/S}$	104,54	0	0	0	0	25,16	0	0	v	0
$Y_{p/S}$ (total)	40,21	0	0	26,15	26,15	0	0	0	u	0
q_p (rFVIII)	0	0	0	0	3,40E-008	-2,52E-011	0	0	s	0
base cálculo	1	0	0	0	0	0	0	0	r	-1

Glicose	Glutamina	Oxigênio	Contaminante	rFVIII	Célula BHK	Gás Carbônico	Água
x	y	z	w	v	u	s	r
A^{-1}							
0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0,5	0	0	0	0,69
-1	0,5	-0,25	3	0,02	0,02	0	3,38
0	0	0	0	0	0,04	-29451875,48	-1,53
0	0	0	0	0	0	29451875,48	0
0	0	0	0	0,04	0	0	-4,16
1	0	0	-2,5	-0,02	-0,01	0	-3,76
0	0	0,5	-2,5	-0,01	-0,01	0	-4,38

$A^{-1} \cdot B$	X	Coef. mássicos
-1,0000	Glicose	-180,18
-0,6908	Glutamina	-100,97
-3,3756	Oxigênio	-108,02
1,5345	Contaminante	40,13
0,0031	rFVIII	0,08
4,1550	Célula BHK	104,54
3,7614	Gás Carbônico	165,54
4,3776	Água	78,88

Materials & Streams Report

for Base_3

November 18, 2010

1. OVERALL PROCESS DATA

Annual Operating Time	6.545,93 h
Annual Throughput	1.603.993,30 MP Entities
Batch Throughput	5.531,01 MP Entities
Recipe Batch Time	47,98 h
Recipe Cycle Time	22,40 h
Number of Batches per Year	290,00

MP Entity = Boxed Entity in Produto

2.1 STARTING MATERIAL REQUIREMENTS

Section	Starting Material	Active Product	Amount Needed (kg Sin/MP Ent)	Molar Yield (%)	Mass Yield (%)	Gross Mass Yield (%)
Perfusão	(none)	(none)	0,00	Unknown	Unknown	Unknown
Inóculo	(none)	(none)	0,00	Unknown	Unknown	Unknown
Purificação	(none)	(none)	0,00	Unknown	Unknown	Unknown
Embalagem	(none)	(none)	0,00	Unknown	Unknown	Unknown

Sin = Section Starting Material, Aout = Section Active Product

2.2 BULK RAW MATERIALS (ENTIRE PROCESS)

Raw Material	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Meio	74.417	256,611	0,046
Air	4.021	13,864	0,003
Tampão A	30.655	105,706	0,019
Tampão B	15.787	54,439	0,010
NaCl (2 M)	10.206	35,194	0,006
Tampão C	70.559	243,306	0,044
Tampão D	511	1,763	0,000
Water	23.218	80,060	0,014
Octoxynol-9	0	0,000	0,000
Sodium Chloride	41	0,141	0,000
Histidina para	4	0,015	0,000
CaChloride	10	0,035	0,000
Tampão E	1.022	3,525	0,001
Tampão F	307	1,057	0,000
Tampão G	307	1,057	0,000
Tampão H	307	1,057	0,000
TNBP	99	0,340	0,000
Triton X-100	290	1,000	0,000
Sucrose	254	0,877	0,000
Histidina	71	0,244	0,000
Glycine	525	1,811	0,000
NaOH (0.1M)	30.172	104,041	0,019
NaOH (0.5 M)	126.545	436,364	0,079
NaOH (0.01 M)	8.105	27,948	0,005
TOTAL	397.432	1.370,455	0,248

2.3 BULK RAW MATERIALS (PER SECTION)

SECTIONS IN: Main Branch

Perfusão

Raw Material	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Meio	70.937	244,611	0,044
Air	2.431	8,384	0,002
TOTAL	73.369	252,996	0,046

Inóculo

Raw Material	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Air	1.589	5,480	0,001
Meio	3.480	12,000	0,002
TOTAL	5.069	17,480	0,003

Purificação

Raw Material	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Tampão A	30.655	105,706	0,019
Tampão B	15.787	54,439	0,010
NaCl (2 M)	10.206	35,194	0,006
Tampão C	70.559	243,306	0,044
Tampão D	511	1,763	0,000
Water	23.218	80,060	0,014
Octoxynol-9	0	0,000	0,000
Sodium Chloride	41	0,141	0,000
Histidina para	4	0,015	0,000
CaChloride	10	0,035	0,000
Tampão E	1.022	3,525	0,001
Tampão F	307	1,057	0,000
Tampão G	307	1,057	0,000
Tampão H	307	1,057	0,000
TNBP	99	0,340	0,000
Triton X-100	290	1,000	0,000
Sucrose	254	0,877	0,000
Histidina	71	0,244	0,000
Glycine	525	1,811	0,000
NaOH (0.1M)	30.172	104,041	0,019
NaOH (0.5 M)	126.545	436,364	0,079
NaOH (0.01 M)	8.105	27,948	0,005
TOTAL	318.994	1.099,980	0,199

2.4 BULK RAW MATERIALS (PER MATERIAL)

Meio

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Perfusão (Main Branch)				
BIO001	95,32	70.937	244,611	0,044
Inóculo (Main Branch)				
SPN001	0,19	139	0,480	0,000
SPN002	0,75	557	1,920	0,000
SPN003	3,74	2.784	9,600	0,002
TOTAL	100,00	74.417	256,611	0,046

Air				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Perfusão (Main Branch)				
BIO001	60,47	2.431	8,384	0,002
Inóculo (Main Branch)				
SPN001	1,27	51	0,177	0,000
SPN002	6,38	256	0,884	0,000
SPN003	31,88	1.282	4,419	0,001
TOTAL	100,00	4.021	13,864	0,003

Tampão A				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTC001	100,00	30.655	105,706	0,019
TOTAL	100,00	30.655	105,706	0,019

Tampão B				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTC001	100,00	15.787	54,439	0,010
TOTAL	100,00	15.787	54,439	0,010

NaCl (2 M)				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTC001	96,86	9.886	34,090	0,006
CIA001	3,14	320	1,104	0,000
TOTAL	100,00	10.206	35,194	0,006

Tampão C				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
DIA001	98,87	69.765	240,568	0,043
CIA001	1,13	794	2,738	0,000
TOTAL	100,00	70.559	243,306	0,044

Tampão D				
Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CIA001	100,00	511	1,763	0,000
TOTAL	100,00	511	1,763	0,000

Water

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQE004	2,45	570	1,965	0,000
DIA002	90,40	20.988	72,374	0,013
DIL001	7,15	1.659	5,721	0,001
TOTAL	100,00	23.218	80,060	0,014

Octoxynol-9

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQE004	100,00	0	0,000	0,000
TOTAL	100,00	0	0,000	0,000

Sodium Chloride

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQE004	1,84	1	0,003	0,000
DIA002	90,97	37	0,128	0,000
DIL001	7,19	3	0,010	0,000
TOTAL	100,00	41	0,141	0,000

Histidina para

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQE004	100,00	4	0,015	0,000
TOTAL	100,00	4	0,015	0,000

CaChloride

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQE004	30,92	3	0,011	0,000
DIA002	64,01	7	0,023	0,000
DIL001	5,06	1	0,002	0,000
TOTAL	100,00	10	0,035	0,000

Tampão E

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTA001	100,00	1.022	3,525	0,001
TOTAL	100,00	1.022	3,525	0,001

Tampão F

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTA001	100,00	307	1,057	0,000
TOTAL	100,00	307	1,057	0,000

Tampão G

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTA001	100,00	307	1,057	0,000
TOTAL	100,00	307	1,057	0,000

Tampão H

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTA001	100,00	307	1,057	0,000
TOTAL	100,00	307	1,057	0,000

TNBP

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQI001	100,00	99	0,340	0,000
TOTAL	100,00	99	0,340	0,000

Triton X-100

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
TQI001	100,00	290	1,000	0,000
TOTAL	100,00	290	1,000	0,000

Sucrose

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
DIA002	92,67	236	0,813	0,000
DIL001	7,33	19	0,064	0,000
TOTAL	100,00	254	0,877	0,000

Histidina

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
DIA002	92,67	65	0,226	0,000
DIL001	7,33	5	0,018	0,000
TOTAL	100,00	71	0,244	0,000

Glycine

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
DIA002	92,67	487	1,678	0,000
DIL001	7,33	38	0,133	0,000
TOTAL	100,00	525	1,811	0,000

NaOH (0.1M)

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
DIA001	98,13	29.609	102,100	0,018
CIA001	1,87	563	1,941	0,000
TOTAL	100,00	30.172	104,041	0,019

NaOH (0.5 M)

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTC001	98,93	125.194	431,705	0,078
CTA001	1,07	1.351	4,659	0,001
TOTAL	100,00	126.545	436,364	0,079

NaOH (0.01 M)

Procedure	% Total	kg/yr	kg/batch	kg/MP Ent
Purificação (Main Branch)				
CTC001	94,56	7.664	26,427	0,005
CIA001	2,72	221	0,761	0,000
CTA001	2,72	221	0,760	0,000
TOTAL	100,00	8.105	27,948	0,005

2.5 BULK RAW MATERIALS (kg/MP Entity): SECTION TOTALS

Raw Material	Perfusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Meio	0,044	0,002	0,000	0,000
Air	0,002	0,001	0,000	0,000
Tampão A	0,000	0,000	0,019	0,000
Tampão B	0,000	0,000	0,010	0,000
NaCl (2 M)	0,000	0,000	0,006	0,000
Tampão C	0,000	0,000	0,044	0,000
Tampão D	0,000	0,000	0,000	0,000
Water	0,000	0,000	0,014	0,000
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,000	0,000	0,000	0,000
Histidina para	0,000	0,000	0,000	0,000
CaChloride	0,000	0,000	0,000	0,000
Tampão E	0,000	0,000	0,001	0,000
Tampão F	0,000	0,000	0,000	0,000
Tampão G	0,000	0,000	0,000	0,000
Tampão H	0,000	0,000	0,000	0,000
TNBP	0,000	0,000	0,000	0,000
Triton X-100	0,000	0,000	0,000	0,000
Sucrose	0,000	0,000	0,000	0,000
Histidina	0,000	0,000	0,000	0,000
Glycine	0,000	0,000	0,000	0,000
NaOH (0.1M)	0,000	0,000	0,019	0,000
NaOH (0.5 M)	0,000	0,000	0,079	0,000
NaOH (0.01 M)	0,000	0,000	0,005	0,000
TOTAL	0,046	0,003	0,199	0,000

2.6 BULK RAW MATERIALS (kg/batch): SECTION TOTALS

Raw Material	Perusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Meio	244,611	12,000	0,000	0,000
Air	8,384	5,480	0,000	0,000
Tampão A	0,000	0,000	105,706	0,000
Tampão B	0,000	0,000	54,439	0,000
NaCl (2 M)	0,000	0,000	35,194	0,000
Tampão C	0,000	0,000	243,306	0,000
Tampão D	0,000	0,000	1,763	0,000
Water	0,000	0,000	80,060	0,000
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,000	0,000	0,141	0,000
Histidina para	0,000	0,000	0,015	0,000
CaChloride	0,000	0,000	0,035	0,000
Tampão E	0,000	0,000	3,525	0,000
Tampão F	0,000	0,000	1,057	0,000
Tampão G	0,000	0,000	1,057	0,000
Tampão H	0,000	0,000	1,057	0,000
TNBP	0,000	0,000	0,340	0,000
Triton X-100	0,000	0,000	1,000	0,000
Sucrose	0,000	0,000	0,877	0,000
Histidina	0,000	0,000	0,244	0,000
Glycine	0,000	0,000	1,811	0,000
NaOH (0.1M)	0,000	0,000	104,041	0,000
NaOH (0.5 M)	0,000	0,000	436,364	0,000
NaOH (0.01 M)	0,000	0,000	27,948	0,000
TOTAL	252,996	17,480	1.099,980	0,000

2.7 BULK RAW MATERIALS (kg/yr): SECTION TOTALS

Raw Material	Perfusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Meio	70.937	3.480	0	0
Air	2.431	1.589	0	0
Tampão A	0	0	30.655	0
Tampão B	0	0	15.787	0
NaCl (2 M)	0	0	10.206	0
Tampão C	0	0	70.559	0
Tampão D	0	0	511	0
Water	0	0	23.218	0
Octoxynol-9	0	0	0	0
Sodium Chloride	0	0	41	0
Histidina para	0	0	4	0
CaChloride	0	0	10	0
Tampão E	0	0	1.022	0
Tampão F	0	0	307	0
Tampão G	0	0	307	0
Tampão H	0	0	307	0
TNBP	0	0	99	0
Triton X-100	0	0	290	0
Sucrose	0	0	254	0
Histidina	0	0	71	0
Glycine	0	0	525	0
NaOH (0.1M)	0	0	30.172	0
NaOH (0.5 M)	0	0	126.545	0
NaOH (0.01 M)	0	0	8.105	0
TOTAL	73.369	5.069	318.994	0

2.8 DISCRETE RAW MATERIALS (ENTIRE PROCESS)

Raw Material	Entities/yr	Entities/batch	Entities/MP Entity
Ampolas	1.603.993	5.531,011	1,000
Caixa com agulh	1.603.993	5.531,011	1,000

2.9 DISCRETE RAW MATERIALS (PER SECTION)

SECTIONS IN: Main Branch

Purificação

Raw Material	Entities/yr	Entities/batch	Entities/MP Entity
Ampolas	1.603.993	5.531,011	1,000

Embalagem

Raw Material	Entities/yr	Entities/batch	Entities/MP Entity
Caixa com agulh	1.603.993	5.531,011	1,000

2.10 DISCRETE RAW MATERIALS (PER MATERIAL)

Ampolas

Discrete Stream	% Total	Entities/yr	Entities/batch	Entities/MP Entity
Purificação (Main Branch)				
Ampolas	100,00	1.603.993	5.531,011	1,000
TOTAL	100,00	1.603.993	5.531,011	1,000

Caixa com agulh

Discrete Stream	% Total	Entities/yr	Entities/batch	Entities/MP Entity
Embalagem (Main Branch)				
Embalagem	100,00	1.603.993	5.531,011	1,000
TOTAL	100,00	1.603.993	5.531,011	1,000

2.11 DISCRETE RAW MATERIALS (Entities/MP Entity): PER SECTION

Raw Material	Perfusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Ampolas	0,000	0,000	1,000	0,000
Caixa com agulha e diluente	0,000	0,000	0,000	1,000
TOTAL	0,000	0,000	1,000	1,000

2.12 DISCRETE RAW MATERIALS (Entities/batch): PER SECTION

Raw Material	Perfusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Ampolas	0,000	0,000	5.531,011	0,000
Caixa com agulha e diluente	0,000	0,000	0,000	5.531,011
TOTAL	0,000	0,000	5.531,011	5.531,011

2.13 DISCRETE RAW MATERIALS (Entities/yr): PER SECTION

Raw Material	Perfusão	Inóculo	Purificação	Embalagem
Ampolas	0	0	1.603.993	0
Caixa com agulha e diluente	0	0	0	1.603.993
TOTAL	0	0	1.603.993	1.603.993

3. STREAM DETAILS

Stream Name	101	M-01	A-01	V-01
Source	Criotubo	INPUT	INPUT	SPN001
Destination	SPN001	SPN001	SPN001	OUTPUT
Stream Properties				
Activity (U/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
Temperature (K)	298,15	298,15	298,15	293,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.050,00	1.000,00	1,18	1,20
Component Flowrates (kg/batch)				
Carb. Dioxide	0,000	0,000	0,000	0,001
Célula BHK	0,000	0,000	0,000	0,000
Glucose	0,000	0,072	0,000	0,000
Glutamina	0,000	0,072	0,000	0,000
Meio de Cultura	0,000	0,337	0,000	0,000
Nitrogen	0,000	0,000	0,136	0,136
Oxygen	0,000	0,000	0,041	0,040
TOTAL (kg/batch)	0,000	0,480	0,177	0,177
TOTAL (L/batch)	0,000	0,480	149,815	147,361

Stream Name	102	M-02	A-02	V-02
Source	SPN001	INPUT	INPUT	SPN002
Destination	SPN002	SPN002	SPN002	OUTPUT
Stream Properties				
Activity (U/ml)	7,83	0,00	0,00	0,00
Temperature (K)	310,15	298,15	298,15	293,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.064,59	1.000,00	1,18	1,20
Component Flowrates (kg/batch)				
Carb. Dioxide	0,000	0,000	0,000	0,005
Contaminante	0,000	0,000	0,000	0,000
Célula BHK	0,001	0,000	0,000	0,000
Glucose	0,070	0,286	0,000	0,000
Glutamina	0,071	0,286	0,000	0,000
Meio de Cultura	0,337	1,347	0,000	0,000
Nitrogen	0,000	0,000	0,678	0,678
Oxygen	0,000	0,000	0,206	0,202
rFVIII	0,000	0,000	0,000	0,000
Water	0,000	0,000	0,000	0,000
TOTAL (kg/batch)	0,480	1,920	0,884	0,886
TOTAL (L/batch)	0,451	1,920	749,602	737,329

Stream Name	103	M-03	A-03	V-03
Source	SPN002	INPUT	INPUT	SPN003
Destination	SPN003	SPN003	SPN003	OUTPUT
Stream Properties				
Activity (U/ml)	9,55	0,00	0,00	0,00
Temperature (K)	310,15	298,15	298,15	293,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.064,43	1.000,00	1,18	1,20
Component Flowrates (kg/batch)				
Carb. Dioxide	0,000	0,000	0,000	0,027
Contaminante	0,002	0,000	0,000	0,000
Célula BHK	0,004	0,000	0,000	0,000
Glucose	0,351	1,432	0,000	0,000
Glutamina	0,354	1,432	0,000	0,000
Meio de Cultura	1,684	6,735	0,000	0,000
Nitrogen	0,000	0,000	3,390	3,390
Oxygen	0,000	0,000	1,029	1,012
rFVIII	0,000	0,000	0,000	0,000
Water	0,003	0,000	0,000	0,000
TOTAL (kg/batch)	2,398	9,600	4,419	4,428
TOTAL (L/batch)	2,253	9,600	3.747,767	3.686,406

Stream Name	104	M-04	106	A-04
Source	SPN003	INPUT	HCL001	INPUT
Destination	BIO001	BIO001	BIO001	BIO001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	9,89	0,00	19,53	0,00
Temperature (K)	310,15	298,15	310,15	298,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.064,40	1.000,00	1.062,83	1,18
Component Flowrates (kg/batch)				
Contaminante	0,008	0,000	1,678	0,000
Célula BHK	0,021	0,000	61,676	0,000
Glucose	1,754	77,581	174,361	0,000
Glutamina	1,770	77,581	177,673	0,000
Meio de Cultura	8,419	364,838	855,392	0,000
Nitrogen	0,000	0,000	0,000	13,673
Oxygen	0,000	0,000	0,000	4,151
rFVIII	0,000	0,000	0,003	0,000
Water	0,016	0,000	3,298	0,000
TOTAL (kg/batch)	11,989	520,000	1.274,081	17,823
TOTAL (L/batch)	11,263	520,000	1.198,759	15.115,094

Stream Name	V-04	105	107	201
Source	BIO001	BIO001	HCL001	TQE001
Destination	OUTPUT	HCL001	TQE001	MFL001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	0,00	19,81	20,46	19,94
Temperature (K)	310,15	310,15	310,15	370,69
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1,19	1.063,01	1.063,45	1.036,02
Component Flowrates (kg/batch)				
Carb. Dioxide	2,987	0,000	0,000	0,000
Contaminante	0,000	2,410	0,732	0,732
Célula BHK	0,000	63,584	1,908	1,908
Glucose	0,000	250,445	76,084	76,084
Glutamina	0,000	255,202	77,529	77,529
Meio de Cultura	0,000	1.228,649	373,258	373,258
Nitrogen	13,673	0,000	0,000	0,000
Oxygen	2,201	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,000	0,005	0,001	0,001
Water	0,000	4,737	1,439	1,439
TOTAL (kg/batch)	18,861	1.805,032	530,951	530,951
TOTAL (L/batch)	15.900,676	1.698,033	499,274	512,491

Stream Name	202	R-01	212	F-01
Source	MFL001	MFL001	CTA001	INPUT
Destination	MFL002	OUTPUT	DIL001	DIL001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	17,36	16,75	959,55	0,00
Temperature (K)	370,93	370,93	298,15	298,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.035,93	1.035,13	1.008,47	1.007,68
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,000	0,000	0,012	0,004
Contaminante	0,714	0,018	0,000	0,000
Célula BHK	1,604	0,304	0,000	0,000
Glucose	74,223	1,861	0,000	0,000
Glutamina	75,633	1,897	0,000	0,000
Glycine	0,000	0,000	0,000	0,282
Histidina	0,000	0,000	0,000	0,038
Histidina para	0,000	0,000	0,023	0,000
Imidazol	0,000	0,000	0,002	0,000
Meio de Cultura	364,127	9,131	0,000	0,000
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,001	0,000	0,001	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,000	0,000	0,084	0,021
Sucrose	0,000	0,000	0,000	0,137
Water	1,210	0,229	3,957	12,163
TOTAL (kg/batch)	517,512	13,439	4,079	12,644
TOTAL (L/batch)	499,562	12,983	4,045	12,548

Stream Name	213	203	R-02	204
Source	DIL001	MFL002	MFL002	TQE002
Destination	DIA002	TQE002	OUTPUT	CTC001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	233,90	15,18	11,85	15,18
Temperature (K)	298,15	371,16	371,16	371,83
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.007,87	1.035,95	1.030,95	1.035,65
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,016	0,000	0,000	0,000
Contaminante	0,000	0,700	0,014	0,700
Célula BHK	0,000	0,000	1,604	0,000
Glucose	0,000	72,747	1,476	72,747
Glutamina	0,000	74,129	1,504	74,129
Glycine	0,282	0,000	0,000	0,000
Histidina	0,038	0,000	0,000	0,000
Histidina para	0,023	0,000	0,000	0,000
Imidazol	0,002	0,000	0,000	0,000
Meio de Cultura	0,000	356,888	7,239	356,888
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,001	0,001	0,000	0,001
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,105	0,000	0,000	0,000
Sucrose	0,137	0,000	0,000	0,000
Water	16,120	0,000	1,210	0,000
TOTAL (kg/batch)	16,723	504,465	13,047	504,465
TOTAL (L/batch)	16,593	486,958	12,655	487,101

Stream Name	EQ-LV-01	EL-01	RG-01	205
Source	INPUT	INPUT	INPUT	CTC001
Destination	CTC001	CTC001	CTC001	TQI001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	0,00	0,00	0,00	111,85
Temperature (K)	298,15	298,15	298,15	298,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.000,00	1.030,00	1.075,00	1.000,19
Component Flowrates (kg/batch)				
Acetato de Amôn	0,000	0,420	0,000	0,000
CaChloride	0,000	0,030	0,000	0,000
Contaminante	0,000	0,000	0,000	0,042
EDTA Disodium	0,000	0,055	0,000	0,000
Histidina para	0,405	0,000	0,000	0,202
Octoxynol-9	0,000	0,012	0,000	0,000
rFVIII	0,000	0,000	0,000	0,001
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,915	2,546	3,706	0,458
Sorbitol	0,000	9,917	0,000	0,000
Water	104,386	41,460	30,385	52,193
TOTAL (kg/batch)	105,706	54,439	34,090	52,896
TOTAL (L/batch)	105,706	52,853	31,712	52,886

Stream Name	R-03	TNBP	TX100	206
Source	CTC001	INPUT	INPUT	TQI001
Destination	OUTPUT	TQI001	TQI001	TQI002
Stream Properties				
Activity (U/ml)	2,38	0,00	0,00	110,49
Temperature (K)	355,70	298,15	298,15	297,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.038,32	2.000,00	2.000,00	1.013,07
Component Flowrates (kg/batch)				
Acetato de Amôn	0,420	0,000	0,000	0,000
CaChloride	0,030	0,000	0,000	0,000
Contaminante	0,658	0,000	0,000	0,042
EDTA Disodium	0,055	0,000	0,000	0,000
Glucose	72,747	0,000	0,000	0,000
Glutamina	74,129	0,000	0,000	0,000
Histidina para	0,202	0,000	0,000	0,202
Meio de Cultura	356,888	0,000	0,000	0,000
Octoxynol-9	0,012	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,000	0,000	0,000	0,001
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	6,709	0,000	0,000	0,458
Sorbitol	9,917	0,000	0,000	0,000
TNBP	0,000	0,340	0,000	0,340
Triton X-100	0,000	0,000	1,000	1,000
Water	124,038	0,000	0,000	52,193
TOTAL (kg/batch)	645,805	0,340	1,000	54,236
TOTAL (L/batch)	621,968	0,170	0,500	53,537

Stream Name	207	EQ-021	208	R-04
Source	TQI002	INPUT	DIA001	DIA001
Destination	DIA001	DIA001	TQE003	OUTPUT
Stream Properties				
Activity (U/ml)	110,65	0,00	89,65	0,00
Temperature (K)	293,15	298,15	297,29	297,29
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.014,53	1.000,00	1.022,74	1.020,62
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,000	0,126	0,028	0,098
Contaminante	0,042	0,000	0,042	0,000
Histidina para	0,202	0,000	0,002	0,200
Imidazol	0,000	0,386	0,087	0,299
rFVIII	0,001	0,000	0,001	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,458	13,256	2,982	10,733
TNBP	0,340	0,000	0,004	0,336
Triton X-100	1,000	0,000	0,011	0,989
Water	52,193	226,799	51,502	227,490
TOTAL (kg/batch)	54,236	240,568	54,659	240,145
TOTAL (L/batch)	53,460	240,568	53,444	235,294

Stream Name	209	EQ-LV-020	EL-02	RG-02
Source	TQE003	INPUT	INPUT	INPUT
Destination	CIA001	CIA001	CIA001	CIA001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	89,60	0,00	0,00	0,00
Temperature (K)	299,00	298,15	298,15	298,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.022,10	1.000,00	1.030,00	1.075,00
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,028	0,001	0,010	0,000
Contaminante	0,042	0,000	0,000	0,000
Ethylene Glycol	0,000	0,000	0,978	0,000
Histidina para	0,002	0,000	0,014	0,000
Imidazol	0,087	0,004	0,000	0,000
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,001	0,000	0,000	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	2,982	0,151	0,000	0,120
TNBP	0,004	0,000	0,000	0,000
Triton X-100	0,011	0,000	0,000	0,000
Water	51,502	2,581	0,761	0,984
TOTAL (kg/batch)	54,659	2,738	1,763	1,104
TOTAL (L/batch)	53,477	2,738	1,711	1,027

Stream Name	210	R-05	DIL-01	211
Source	CIA001	CIA001	INPUT	TQE004
Destination	TQE004	OUTPUT	TQE004	CTA001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	4.292,02	8,28	0,00	1.438,20
Temperature (K)	298,15	298,94	298,15	299,67
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.022,52	1.023,77	1.001,12	1.007,74
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,001	0,039	0,011	0,011
Contaminante	0,000	0,042	0,000	0,000
Ethylene Glycol	0,000	0,978	0,000	0,000
Histidina para	0,000	0,016	0,015	0,015
Imidazol	0,002	0,089	0,000	0,002
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,001	0,000	0,000	0,001
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,057	3,196	0,003	0,059
TNBP	0,000	0,004	0,000	0,000
Triton X-100	0,000	0,011	0,000	0,000
Water	0,968	54,860	1,965	2,933
TOTAL (kg/batch)	1,027	59,236	1,994	3,022
TOTAL (L/batch)	1,005	57,861	1,992	2,998

Stream Name	EQ-LV-03	EL-03	RG-031	RG-032
Source	INPUT	INPUT	INPUT	INPUT
Destination	CTA001	CTA001	CTA001	CTA001
Stream Properties				
Activity (U/ml)	0,00	0,00	0,00	0,00
Temperature (K)	298,15	298,15	298,15	298,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.030,00	1.030,00	1.030,00	1.030,00
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,019	0,000	0,000	0,000
Ethylene Glycol	0,645	0,000	0,000	0,000
Histidina para	0,026	0,008	0,000	0,000
Na2HPO4	0,000	0,000	0,000	0,015
NaH2PO4	0,000	0,000	0,013	0,000
Octoxynol-9	0,001	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,003	0,025	0,124	0,124
Water	2,830	1,024	0,921	0,919
TOTAL (kg/batch)	3,525	1,057	1,057	1,057
TOTAL (L/batch)	3,422	1,027	1,027	1,027

Stream Name	R-06	F-02	214	R-07
Source	CTA001	INPUT	DIA002	DIA002
Destination	OUTPUT	DIA002	EMB001	OUTPUT
Stream Properties				
Activity (U/ml)	79,17	0,00	222,20	0,00
Temperature (K)	298,15	298,15	298,21	298,21
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	1.035,34	1.007,68	1.007,66	1.007,70
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,019	0,023	0,005	0,033
Ethylene Glycol	0,645	0,000	0,000	0,000
Glycine	0,000	1,678	0,372	1,588
Histidina	0,000	0,226	0,050	0,214
Histidina para	0,026	0,000	0,000	0,023
Imidazol	0,000	0,000	0,000	0,002
Na2HPO4	0,015	0,000	0,000	0,000
NaH2PO4	0,013	0,000	0,000	0,000
Octoxynol-9	0,001	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,000	0,000	0,001	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,250	0,128	0,029	0,204
Sucrose	0,000	0,813	0,180	0,769
Water	4,670	72,374	16,083	72,411
TOTAL (kg/batch)	5,640	75,241	16,720	75,244
TOTAL (L/batch)	5,447	74,667	16,593	74,669

Stream Name	Ampolas	301	V-07	302
Source	INPUT	EMB001	LIO001	LIO001
Destination	EMB001	LIO001	OUTPUT	EMB002
Stream Properties				
Activity (U/ml)	0,00	83,05	22,91	118,12
Temperature (K)	298,15	298,17	285,15	285,15
Pressure (kPa)	101,30	101,30	101,30	101,30
Density (g/L)	994,70	999,55	999,44	1.007,14
Component Flowrates (kg/batch)				
CaChloride	0,000	0,005	0,000	0,005
Embalagem	27,655	27,655	0,000	27,655
Glycine	0,000	0,372	0,000	0,372
Histidina	0,000	0,050	0,000	0,050
Histidina para	0,000	0,000	0,000	0,000
Imidazol	0,000	0,000	0,000	0,000
Octoxynol-9	0,000	0,000	0,000	0,000
rFVIII	0,000	0,001	0,000	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,000	0,000
Sodium Chloride	0,000	0,029	0,000	0,029
Sucrose	0,000	0,180	0,000	0,180
Water	0,000	16,083	16,083	0,000
TOTAL (kg/batch)	27,655	44,375	16,083	28,292
TOTAL (L/batch)	27,802	44,395	16,092	28,092

Stream Name	Produto
Source	EMB002
Destination	OUTPUT
Stream Properties	
Activity (U/ml)	10,84
Temperature (K)	296,94
Pressure (kPa)	101,30
Density (g/L)	995,85
Component Flowrates (kg/batch)	
CaChloride	0,005
Embalagem	304,206
Glycine	0,372
Histidina	0,050
Histidina para	0,000
Imidazol	0,000
Octoxynol-9	0,000
rFVIII	0,000
rFVIII inativo	0,000
Sodium Chloride	0,029
Sucrose	0,180
TOTAL (kg/batch)	304,843
TOTAL (L/batch)	306,114

4. OVERALL COMPONENT BALANCE (kg/Batch)

COMPONENT	INITIAL	INPUT	OUTPUT	FINAL
Acetato de Amôn	0,000	0,420	0,420	0,000
CaChloride	0,000	0,222	0,224	0,000
Carb. Dioxide	0,000	0,000	3,020	0,000
Contaminante	0,000	0,000	0,732	0,000
Célula BHK	0,000	0,000	1,908	0,000
EDTA Disodium	0,000	0,055	0,055	0,000
Embalagem	0,000	304,206	304,206	0,000
Ethylene Glycol	0,000	1,624	1,624	0,000
Glucose	0,000	38,285	76,084	0,000
Glutamina	0,000	38,285	77,529	0,000
Glycine	0,000	1,811	1,960	0,000
Histidina	0,000	0,244	0,264	0,000
Histidina para	0,000	0,468	0,468	0,000
Imidazol	0,000	0,391	0,391	0,000
Meio de Cultura	0,000	180,042	373,258	0,000
Na2HPO4	0,000	0,015	0,015	0,000
NaH2PO4	0,000	0,013	0,013	0,000
Nitrogen	0,539	10,635	17,876	0,128
Octoxynol-9	0,000	0,013	0,013	0,000
Oxygen	0,164	3,229	3,456	0,039
rFVIII	0,000	0,000	0,001	0,000
rFVIII inativo	0,000	0,000	0,001	0,000
Sodium Chloride	0,000	21,109	21,121	0,000
Sodium Hydroxid	0,000	8,980	8,980	0,000
Sorbitol	0,000	9,917	9,917	0,000
Sucrose	0,000	0,877	0,949	0,000
TNBP	0,000	0,340	0,340	0,000
Triton X-100	0,000	1,000	1,000	0,000
Water	0,000	1.052,483	1.060,363	0,000
TOTAL	0,703	1.674,661	1.966,185	0,166

5. EQUIPMENT CONTENTS

C-101

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
CTC001	START	7,447	0,000
	AFTER AUTO-INIT	7,447	487,101
CTC001	EQUILIBRATE-1 (Column Equilibration)	7,634	487,101
CTC001	LOAD-1 (PBA Column Loading)	9,357	0,000
CTC001	WASH-1 (Column Wash)	9,544	0,000
CTC001	ELUTE-1 (Column Elution)	9,731	0,000
CTC001	REGENERATE-1 (Column Regeneration)	9,843	0,000
CTC001	CIP-1 (In-Place-Cleaning)	11,843	0,000
CTC001	CIP-2 (In-Place-Cleaning)	29,843	0,000

V-104

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
TQI001	START	9,731	0,000
TQI001	TRANSFER-IN-1 (Transfer In)	9,918	52,886
TQI001	CHARGE-1 (Charge)	9,732	53,056
TQI001	CHARGE-2 (Charge)	9,734	53,556
TQI001	AGITATE-1 (Agitation)	10,734	53,558
TQI001	COOL-1 (Batch Cooling)	10,817	53,537
TQI001	END	10,817	0,000

V-105

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
TQI002	START	10,817	0,000
TQI002	TRANSFER-IN-1 (Transfer In)	10,998	53,537
TQI002	AGITATE-1 (Agitation)	15,998	53,545
TQI002	COOL-1 (Batch Cooling)	16,082	53,460
TQI002	END	16,082	0,000

C-102

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
CIA001	START	26,676	0,000
	AFTER AUTO-INIT	26,676	53,477
CIA001	EQUILIBRATE-1 (Column Equilibration)	26,732	53,477
CIA001	LOAD-1 (PBA Column Loading)	28,469	0,000
CIA001	WASH-1 (Column Wash)	28,525	0,000
CIA001	ELUTE-1 (Column Elution)	28,558	0,000
CIA001	REGENERATE-1 (Column Regeneration)	28,591	0,000
CIA001	CIP-1 (In-Place-Cleaning)	29,291	0,000
CIA001	CIP-2 (In-Place-Cleaning)	47,291	0,000

C-103

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
CTA001	START	29,725	0,000
	AFTER AUTO-INIT	29,725	2,998
CTA001	EQUILIBRATE-1 (Column Equilibration)	29,752	2,998
CTA001	LOAD-1 (PBA Column Loading)	29,801	0,000
CTA001	WASH-1 (Column Wash)	29,829	0,000
CTA001	ELUTE-1 (Column Elution)	29,846	0,000
CTA001	REGENERATE-1 (Column Regeneration)	29,868	0,000
CTA001	REGENERATE-2 (Column Regeneration)	29,884	0,000
CTA001	CIP-1 (In-Place-Cleaning)	29,984	0,000
CTA001	CIP-2 (In-Place-Cleaning)	47,984	0,000

DFR-101

Procedure	Operation	Time (in h)	Volume (in L)
LIO001	START	33,832	0,000
	AFTER AUTO-INIT	33,832	44,395
LIO001	DRY-1 (Discrete Freeze Drying)	39,832	28,092
LIO001	END	39,832	0,000

Economic Evaluation Report for Base_3

November 18, 2010

1. EXECUTIVE SUMMARY (2010 prices)

Total Capital Investment	23.542.000 \$
Capital Investment Charged to This Project	23.542.000 \$
Operating Cost	26.829.000 \$/yr
Production Rate	1.603.993,30 Entities/yr in Producto
Unit Production Cost	16,73 \$/Entity in Producto
Total Revenues	184.459.000 \$/yr
Gross Margin	85,46 %
Return On Investment	410,05 %
Payback Time	0,24 years
IRR (After Taxes)	232,42 %
NPV (at 20.0% Interest)	295.145.000 \$

Entity = Boxed Entity

MP = Flow of Discrete Entity Boxed Entity in Stream Producto

2. MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2010 prices)

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (\$)	Cost (\$)
2/0	V-101	Fermentor Vessel Volume = 35.00 L	461.000	922.000
1/0	CY-101	Hydrocyclone Rated Throughput = 35.39 L/h	2.000	2.000
1/0	MF-101	Microfilter Membrane Area = 1.80 m2	24.000	24.000
1/0	MF-102	Microfilter Membrane Area = 1.80 m2	24.000	24.000
1/0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 700.00 L	170.000	170.000
1/0	V-103	Blending Tank Vessel Volume = 350.00 L	154.000	154.000
1/0	C-101	PBA Chromatography Column Column Volume = 13.21 L	130.000	130.000
1/0	V-104	Blending Tank Vessel Volume = 70.47 L	137.000	137.000
1/0	V-105	Blending Tank Vessel Volume = 70.45 L	137.000	137.000
1/0	DF-101	Diafilter Membrane Area = 0.10 m2	26.000	26.000
1/0	V-106	Blending Tank Vessel Volume = 100.00 L	137.000	137.000
1/0	C-102	PBA Chromatography Column Column Volume = 0.38 L	150.000	150.000
1/0	V-107	Blending Tank Vessel Volume = 5.00 L	137.000	137.000
1/0	C-103	PBA Chromatography Column Column Volume = 0.38 L	150.000	150.000
2/0	FL-101	Filler Discrete Throughput = 2765.51 entities/h	0	0
2/0	BX-101	Packer Discrete Throughput = 2765.51 entities/h	0	0
1/0	DFR-101	Discrete Freeze Dryer Sublimation Capacity = 16.08 kg	139.000	139.000
1/0	DF-102	Diafilter Membrane Area = 0.10 m2	26.000	26.000
1/0	TTR-101	Test Tube Rack Container Volume = 15.00 mL	0	0
1/0	SFR-101	Shake Flask Rack Container Volume = 0.75 L	0	0
1/0	SFR-102	Shake Flask Rack	0	0

		Container Volume = 3.00 L		
1/0	SFR-103	Shake Flask Rack	0	0
		Container Volume = 16.00 L		
1/0	MX-101	Mixer	0	0
		Size/Capacity = 0.35 kg/h		
		Unlisted Equipment		615.000
			TOTAL	3.077.000

3. FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2010 prices in \$)

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)

1. Equipment Purchase Cost	3.077.000
2. Installation	938.000
3. Process Piping	1.077.000
4. Instrumentation	1.231.000
5. Insulation	92.000
6. Electrical	308.000
7. Buildings	2.769.000
8. Yard Improvement	462.000
9. Auxiliary Facilities	1.231.000
TPDC	11.184.000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)

10. Engineering	2.796.000
11. Construction	3.914.000
TPIC	6.710.000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)

TPC	17.894.000
------------	-------------------

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)

12. Contractor's Fee	895.000
13. Contingency	1.789.000
CFC = 12+13	2.684.000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)

DFC	20.579.000
------------	-------------------

4. LABOR COST - PROCESS SUMMARY

Labor Type	Unit Cost (\$/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (\$)	%
Operator	69,00	148.532	10.249.000	100,00
TOTAL		148.532	10.249.000	100,00

5. RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY

Bulk Raw Material	Unit Cost (\$/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (\$)	%
Meio	11,328	74.417	843.000	19,68
Air	0,000	4.021	0	0,00
Tampão A	1,930	30.655	59.000	1,38
Tampão B	2,624	15.787	41.000	0,97
NaCl (2 M)	0,784	10.206	8.000	0,19
Tampão C	0,964	70.559	68.000	1,59
Tampão D	17,315	511	9.000	0,21
Water	0,000	23.218	0	0,00
Octoxynol-9	211,967	0	0	0,00
Sodium Chloride	7,210	41	0	0,01
Histidina para	487,710	4	2.000	0,05
CaChloride	39,920	10	0	0,01
Tampão E	8,302	1.022	8.000	0,20
Tampão F	3,969	307	1.000	0,03
Tampão G	2,150	307	1.000	0,02
Tampão H	1,899	307	1.000	0,01
TNBP	38,908	99	4.000	0,09
Triton X-100	192,600	290	56.000	1,30
Sucrose	510,000	254	130.000	3,03
Glycine	460,000	525	242.000	5,64
Histidina	5.020,000	71	355.000	8,28
NaOH (0.1M)	0,077	30.172	2.000	0,05
NaOH (0.5 M)	0,378	126.545	48.000	1,12
NaOH (0.01 M)	0,008	8.105	0	0,00
Discrete Raw Material	Unit Cost (\$/Entity)	Annual Amount (Entities)	Annual Cost(\$)	%
Ampolas	0,500	1.603.993	802.000	18,72
Caixa com agulha	1,000	1.603.993	1.604.000	37,44
TOTAL			4.284.000	100,00

6. VARIOUS CONSUMABLES COST (2010 prices) - PROCESS SUMMARY

Consumable	Units Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Dft Membrane	400,000	0	m2	0	0,00
5 mL Test Tube	0,500	6	item	0	0,00
250 mL Shake Flask	1,600	6	item	0	0,00
4000 mL Shake Flask	2,000	8	item	0	0,01
Membrana de microfiltração 12"	196,270	522	m2	102.000	37,82
Membrana de microfiltração 30"	255,280	131	m2	33.000	12,30
Resina de troca catiônica	721,830	20	L	15.000	5,45
Resina de troca aniônica	917,810	1	L	1.000	0,22
Membrana de diafiltração 30kDa	5.514,000	15	m2	80.000	29,52
Resina de imunoafinidade	10.012,090	4	L	40.000	14,67
500 mL Shake Flask	1,700	12	item	0	0,01
TOTAL				271.000	100,00

7. WASTE TREATMENT/DISPOSAL COST (2010 prices) - PROCESS SUMMARY

Waste Category	Unit Cost (\$/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (\$)	%
Solid Waste		0	0	0,00
Aqueous Liquid		305.241	3.052.000	100,00
R-03	10,000	187.283	1.873.000	61,36
R-05	10,000	17.178	172.000	5,63
R-06	10,000	1.635	16.000	0,54
R-01	10,000	3.897	39.000	1,28
R-02	10,000	3.784	38.000	1,24
R-04	10,000	69.642	696.000	22,82
R-07	10,000	21.821	218.000	7,15
Organic Liquid		0	0	0,00
Emissions		11.726	0	0,00
TOTAL		316.967	3.052.000	100,00

8. UTILITIES COST (2010 prices) - PROCESS SUMMARY

Utility	Annual Amount	Reference Units	Annual Cost (\$)	%
Electricity	9.216	kWh	922	90,79
Steam	9.328	kg	39	3,86
Steam (High P)	0	kg	0	0,00
Cooling Water	44.973	kg	4	0,44
Chilled Water	124.496	kg	50	4,91
TOTAL			1.015	100,00

9. ANNUAL OPERATING COST (2010 prices) - PROCESS SUMMARY

Cost Item	\$	%
Raw Materials	4.284.000	15,97
Labor-Dependent	10.249.000	38,20
Facility-Dependent	3.847.000	14,34
Laboratory/QC/QA	5.124.000	19,10
Consumables	271.000	1,01
Waste Treatment/Disposal	3.052.000	11,38
Utilities	1.000	0,00
Transportation	0	0,00
Miscellaneous	0	0,00
Advertising/Selling	0	0,00
Running Royalties	0	0,00
Failed Product Disposal	0	0,00
TOTAL	26.829.000	100,00

10. PROFITABILITY ANALYSIS (2010 prices)

A.	Direct Fixed Capital	20.579.000 \$
B.	Working Capital	1.934.000 \$
C.	Startup Cost	1.029.000 \$
D.	Up-Front R&D	0 \$
E.	Up-Front Royalties	0 \$
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	23.542.000 \$
G.	Investment Charged to This Project	23.542.000 \$

H. Revenue Stream Flowrates

	Boxed Entity in Produto	1.603.993 Entities/yr
--	-------------------------	-----------------------

I. Production Unit Cost

	Boxed Entity in Produto	16,73 \$/Entity
--	-------------------------	-----------------

J. Selling / Processing Price

	Boxed Entity in Produto	115,00 \$/Entity
--	-------------------------	------------------

K. Revenues

	Produto	184.459.000 \$/yr
--	---------	-------------------

L.	Annual Operating Cost	26.829.000 \$/yr
M.	Gross Profit (K-L)	157.630.000 \$/yr
N.	Taxes (40%)	63.052.000 \$/yr
O.	Net Profit (M-N + Depreciation)	96.533.000 \$/yr

	Gross Margin	85,46 %
	Return On Investment	410,05 %
	Payback Time	0,24 years

Cash Flow Analysis Report

Base_3

November 18, 2010

1. CASH FLOW ANALYSIS (thousand \$)

Year	Capital Investment	Debt Finance	Sales Revenues	Operating Cost	Gross Profit	Loan Payments	Depreciation	Taxable Income	Taxes	Net Profit	Net Cash Flow
1	- 6.174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	- 6.174
2	- 8.231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	- 8.231
3	- 8.108	0	122.973	22.585	100.388	0	1.955	100.388	40.155	62.188	54.080
4	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
5	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
6	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
7	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
8	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
9	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
10	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
11	0	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	96.533
12	2.963	0	184.459	26.829	157.630	0	1.955	157.630	63.052	96.533	99.496

IRR/NPV SUMMARY

IRR Before Taxes	320.86 %	Interest %	20,00	23,00	26,00
IRR After Taxes	232.42 %	NPV	295.145,00	257.553,00	226.238,00

Depreciation Method: Straight-Line

DFC Salvage Fraction: 0.050

2. LOAN INFORMATION (thousand \$)

	Direct Fixed Capital	Working Capital	Up Front R&D	Up Front Royalties
Amount	20.579	1.934	0	0
Equity (%)	100	100	100	100
Debt (%)	0	0	0	0
Interest (%)	9	12	12	12
Loan Time (yrs)	10	6	6	6

3. BREAKDOWN OF CAPITAL OUTLAY (\$)

Year	Direct Fixed Capital	Working Capital	Start-Up Cost	Up Front R&D	Up Front Royalties	Total
1	- 6.173.559	0	0	0	0	- 6.173.559
2	- 8.231.412	0	0	0	0	- 8.231.412
3	- 6.173.559	- 1.934.338	- 1.028.927	0	0	- 8.107.897
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	1.028.927	1.934.338	0	0	0	2.963.265

4. BREAKDOWN OF LOAN PAYMENT (\$)

Year	Direct Fixed Capital	Working Capital	Up Front R&D	Up Front Royalties	Total
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0

