



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química



Projeto Final de Curso
Engenharia de Bioprocessos

**Dimensionamento e avaliação técnico-econômica
de uma planta de vacina inativada de
febre amarela**

Raíssa Calado Tavares

Orientadores

**Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.
Tânia Pinheiro Pato Cunha, D.Sc.**

Setembro de 2017

Dimensionamento e avaliação técnico-econômica de uma planta de vacina inativada de febre amarela

Raíssa Calado Tavares

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

Aprovado por:

Luciane Pinto Gaspar, D.Sc.
(Bio-Manguinhos / Fiocruz)

Antônio de Padua Risolia Barbosa, D.Sc.
(Bio-Manguinhos / Fiocruz)

Prof. José Eduardo Pessoa de Andrade, M.Sc.
(Escola de Química e BNDES)

Orientado por:

Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.
(COPPE/UFRJ)

Tânia Pinheiro Pato Cunha, D.Sc.
(Bio-Manguinhos / Fiocruz)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Setembro de 2017

Tavares, Raíssa Calado

Dimensionamento e avaliação técnico-econômica de uma planta de vacina inativada de febre amarela, produzida a partir de células Vero / Raíssa Calado Tavares. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho e Tânia Pinheiro Pato Cunha.

1. Vacina inativada para febre amarela. 2. Células Vero. 3. Dimensionamento e escalonamento. 4. Custos de produção. 5. Investimento capital 6. Viabilidade econômica. 7. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 8. Leda dos Reis Castilho e Tânia Pinheiro Pato Cunha.

“Educação é o único bem que ninguém consegue lhe tirar.”

Meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Escola de Química por me proporcionar um espaço de aprendizagem, onde pude crescer como pessoa e como profissional.

Às minhas orientadoras, Leda Castilho e Tânia Cunha, pela grande dedicação, apoio e conhecimento transmitido. Sou muito grata a vocês e espero que sintam orgulho deste trabalho.

Aos representantes das empresas mencionadas no trabalho, ao Diogo Mattos e ao Fábio Oroski, que disponibilizaram dados essenciais para a realização do projeto.

Aos meus colegas do TBioFar, que compartilharam comigo a experiência do curso e as dificuldades na realização de nossos respectivos projetos na área de imunobiológicos.

Aos meus colegas da empresa Assessa, com quem aprendi muito a respeito de eficiência de trabalho, e ao Prof. Daniel Barreto, que acreditou no meu potencial e capacidade.

A meus amigos de EQ, que me acompanharam em todas as etapas da faculdade, nunca deixando de me incentivar. Cada pessoa me marcou de uma forma, mostrando diferentes perspectivas de vida. Agradeço especialmente ao João Carlos Lopes pelo apoio nessa reta final.

Finalmente, à minha família, principalmente meus pais, que me proporcionaram tudo. Dedico esse projeto a vocês.

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

Dimensionamento e avaliação técnico-econômica de uma planta de vacina inativada de febre amarela

Raíssa Calado Tavares

Setembro, 2017

Orientadores: Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.
Tânia Pinheiro Pato Cunha, D.Sc.

Surtos de febre amarela têm ocorrido recentemente, de forma alarmante, em países da África e das Américas do Sul e Central. Este trabalho analisa a viabilidade econômica de produção de uma nova vacina purificada e inativada contra a febre amarela, por meio do cultivo em células Vero em biorreatores sob condições isentas de componentes de origem animal, desenvolvida no âmbito de um projeto conjunto do LECC/COPPE/UFRJ e Bio-Manguinhos/Fiocruz. Com este novo produto pretende-se diminuir a incidência de eventos adversos graves associados à vacina atenuada, possibilitar a imunização de indivíduos com alergia às proteínas de ovo, imunossuprimidos, idosos e bebês (excluídos das campanhas atuais), bem como aumentar a capacidade produtiva, adotando uma nova plataforma tecnológica.

Para este estudo de viabilidade econômica, foi realizada uma análise do mercado que apontou uma demanda anual de 60 milhões de doses de vacina. Com este dado se pôde definir a escala de produção e, conseqüentemente, dimensionar os equipamentos do processamento *upstream* e *downstream*.

A análise econômica indicou um investimento capital de USD 9,1 milhões para construir e equipar a planta de produção do Ingrediente Farmacêutico Ativo, e um custo de produção de USD 0,31, incluindo o processamento final. O cálculo do valor presente líquido, da taxa interna de retorno e do tempo de retorno mostrou que o projeto proposto é economicamente viável. Também foram realizadas análises de sensibilidade a parâmetros críticos, como preço de venda do produto, taxa mínima de atratividade (TMA) e custos de estudos clínicos.

Palavras Chave: vacina inativada para febre amarela, células Vero, dimensionamento e escalonamento, custos de produção, investimento capital, viabilidade econômica.

Abstract of Final Project presented to Escola de Química as partial fulfillment of the requirements for the degree of Bioprocess Engineer

Sizing and technical-economic evaluation of an inactivated vaccine plant for yellow fever

Raíssa Calado Tavares

September, 2017

Supervisors: Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.Ing.
Tânia Pinheiro Pato Cunha, D.Sc.

Outbreaks of yellow fever have recently occurred, alarmingly, in countries in Africa and South and Central America. This work analyzes the economic feasibility for the production of a new purified and inactivated vaccine against yellow fever by cultivating Vero cells in bioreactors under conditions free of animal components developed under a joint project of LECC/COPPE/UFRJ and Bio-Manguinhos/Fiocruz. This new product is intended to reduce the incidence of serious adverse events associated with the attenuated vaccine, to enable the immunization of individuals with allergy to egg proteins, immunosuppressed, elderly and babies (excluded from the current campaigns), as well as to increase productive capacity, adopting a new technological platform.

For this economic feasibility study, a market analysis was conducted that indicated an annual demand of 60 million doses of vaccine. With this data, it was possible to define the scale of production and, consequently, to size the equipment of the upstream and downstream processing.

The economic analysis indicated a capital investment of USD 9.1 million to build and equip the Active Pharmaceutical Ingredient production plant, and a production cost of USD 0.31, including final processing. The calculation of net present value, internal rate of return, and payback showed that the proposed project is economically viable. Sensitivity analyzes were also performed on critical parameters, such as selling price per product dose, minimum attractiveness rate and costs of clinical studies.

Keywords: inactivated vaccine for yellow fever, Vero cells, sizing and scaling, production cost, capital investment, economic feasibility.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução.....	13
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	15
2.1. A doença amarílica.....	15
2.1.1. Aspectos Clínicos	15
2.1.2. O agente.....	16
2.1.3. Hospedeiro, vetor e transmissão	18
2.1.4. Epidemiologia.....	20
2.2. A vacina amarílica.....	24
2.2.1. História	25
2.2.2. Efeitos adversos	26
2.2.3. Demanda e suprimento	28
2.2.4. Preço	31
2.3. Processo Produtivo.....	32
2.3.1. Plataforma Tecnológica Atual	32
2.3.2. Plataforma Tecnológica Proposta	33
2.4. Desenvolvimento do Imunobiológico e Aspectos Regulatórios	36
Capítulo 3 – Objetivos	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos	38
Capítulo 4 – Análise de Mercado.....	39
4.1. Mercado Internacional	39
4.2. Mercado Nacional	40
4.3. Mercado de Bio-Manguinhos	43
4.4. Projeção de Demanda e Fornecimento.....	44
Capítulo 5 – Processo Produtivo Industrial	46
5.1. Propagação.....	50
5.2. Cultivo	51
5.2.1. Fase de crescimento celular inicial	52
5.2.3. Fase de Infecção	53
5.3. Clarificação.....	53
5.4. Purificação – Etapa de Captura (cromatografia de troca iônica)	55

5.5. Purificação – Etapa de Polimento (cromatografia multimodal).....	57
5.6. Inativação Viral.....	59
5.7. Processamento Final	59
5.8. Dimensionamento da Planta.....	60
Capítulo 6 – Análise de Viabilidade Econômica	62
6.1. Planejamento - Horizonte Temporal.....	63
6.2. Investimento de Desenvolvimento e Assuntos Regulatórios.....	64
6.3. Investimento Total da Planta	65
6.3.1. Preço dos Equipamentos.....	67
6.3.2. Construção de Áreas limpas	68
6.3.3. Investimento Total da Planta	69
6.4. Custos de Produção.....	69
6.4.1. Preço de Matérias-primas (Insumos).....	71
6.4.2. Custo Total de Produção.....	73
6.5. Análise de Viabilidade Econômica	74
6.5.1. Fluxo de Caixa e Demonstração de Resultados de Exercício (DRE).....	75
6.5.2. Valor Presente Líquido (VPL).....	79
6.5.3. Taxa Interna de Retorno (TIR)	80
6.5.4. Tempo de Retorno (<i>Payback</i>).....	80
6.5.5. Ponto de Nivelamento	81
6.6. Análise de Sensibilidade.....	82
6.6.1. Sensibilidade em relação ao preço por dose	82
6.6.2. Sensibilidade em relação à TMA.....	83
6.6.3. Sensibilidade em relação ao custo dos Estudos Clínicos	84
6.6.4. Sensibilidade em relação ao número de voluntários na fase III de estudos clínicos.....	86
Capítulo 7 – Conclusões e sugestões	88
7.1. Sugestões para trabalhos futuros	89
Referências Bibliográficas.....	92

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Pirâmide de Febre Amarela: manifestações clínicas.....	15
Figura 2 - Organização estrutural do vírus da febre amarela em sua forma intracelular imatura (lado esquerdo) e extracelular madura (lado direito).	18
Figura 3 - O ciclo de transmissão do vírus de febre amarela na África (A) e América do Sul (B). ..	20
Figura 4 - Mapa de Risco de Febre Amarela na África.	21
Figura 5 - Mapa de Risco de Febre Amarela na América do Sul.....	22
Figura 6 - Série histórica de casos humanos confirmados de febre amarela e taxas de letalidade, Brasil, 1980-2016.....	23
Figura 7 - Fornecimento de vacina de Febre Amarela pela UNICEF e previsão de demanda até 2017.	29
Figura 8 - Área Com e Sem Recomendação de Vacinação de Febre Amarela no Brasil, 2017.....	30
Figura 9 - Preço, em dólar americano, por dose de vacina durante os anos, com previsão de 2017. 31	
Figura 10 - Comparação entre os processos de produção de vacina atenuada (plataforma atual) e a vacina inativada (plataforma proposta).....	35
Figura 11 - Gráfico de aquisição e aplicação de doses de vacina por parte do MS de 2004 até 03/2017.	42
Figura 12 - Gráfico de variação de preço da dose fornecida ao MS, em Real e Dólar americano. ...	42
Figura 13- Gráfico de Fornecimento por ano pelo fabricante Bio-Manguinhos.....	44
Figura 14 - Diagrama de blocos do processo produtivo proposto.	49
Figura 15 - Layout preliminar da planta produtiva proposta.	61
Figura 16 - Gráfico de sensibilidade do preço unitário.....	83
Figura 17 - Gráfico de Sensibilidade à TMA.....	84
Figura 18 - Gráfico de Sensibilidade aos custos de ensaios clínicos.....	86
Figura 19 - Gráfico de Sensibilidade da variação do nº de voluntários da fase III de estudos clínicos.	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de doses compradas e aplicadas pelo Ministério da Saúde em seu ano de aquisição, com seu respectivo valor unitário.....	41
Tabela 2 - Fornecimento doses de vacina para febre amarela por Bio-Manguinhos.....	43
Tabela 3- Cronograma semanal operacional do cultivo da planta de vacina de FA.....	47
Tabela 4 - Rendimento das etapas do processo produtivo.....	48
Tabela 5 - Escalonamento da propagação de células.....	51
Tabela 6 - Escalonamento do cultivo.....	52
Tabela 7 - Quantidade de meio de cultivo na escala industrial.....	52
Tabela 8 - Quantidade de reposição de meio de cultivo na escala industrial.....	53
Tabela 9 - Escalonamento da clarificação.....	54
Tabela 10 - Escalonamento da cromatografia de troca iônica.....	56
Tabela 11 - Soluções aplicadas em cada etapa da cromatografia de troca iônica.....	56

Tabela 12 - Escalonamento da cromatografia multimodal	58
Tabela 13 - Soluções aplicadas em cada fase da cromatografia multimodal.	58
Tabela 14 - Metragem e classificação das salas para layout da planta produtiva proposta.	60
Tabela 15 - Taxas de Câmbio	63
Tabela 16 - Horizonte temporal de etapas de desenvolvimento da vacina de FA e sua planta produtiva	64
Tabela 17 - Planejamento e custo médio de estudos clínicos e regulatórios.....	65
Tabela 18 - Modelo para cálculo do Investimento Total	67
Tabela 19 - Cotação de Equipamentos.....	68
Tabela 20 - Custo de áreas limpas da Planta produtiva.	69
Tabela 21 - Custos de Investimento do Projeto	69
Tabela 22 - Modelo para cálculo do Custo de Produção (CTP).....	71
Tabela 23 - Cotação dos insumos do processo por ano.	72
Tabela 24 - Custo Total de Produção (CTP) sem considerar o processamento final.....	73
Tabela 25 - Custo Total de Produção (CTP) considerando o processamento final.....	74
Tabela 26 – Demonstração de Resultados de Exercício (DRE).....	76
Tabela 27 - Fluxo de Caixa até ano 8.....	77
Tabela 28 - Fluxo de Caixa de ano 9 até 18.....	78
Tabela 29 - Sensibilidade do preço por cada dose	82
Tabela 30 - Sensibilidade à TMA	84
Tabela 31 - Sensibilidade dos Custos de Estudos Clínicos.....	85
Tabela 32 - Sensibilidade do nº de voluntários da fase III de estudos clínicos.....	87

NOMENCLATURA

AE – Aquisição de Equipamentos
 ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 BPF – Boas Práticas de Fabricação
 CG – Capital de Giro
 CMP – Custos de Matéria-prima
 DRE – Demonstração de Resultados de Exercício
 e-SIC – Sistema Eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão
 ECACC - *European Collection of Animal Cell Cultures* (coleção europeia de cultura de célula animal)
 GAVI – *Global Alliance for Vaccines and Immunisation* (Aliança Global de Vacinas e Imunizações)
 ID – Investimentos diretos
 IF – Investimento Fixo
 IFA – Ingrediente Farmacêutico Ativo
 ISBL – *Inside Battery Limits* (custos dentro do processo)
 LAFAM - Laboratório de Febre Amarela
 LECC - Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares
 MAL – Material Air Lock (antecâmaras de entrada ou saída de materiais)
 MOP – Mão-de-obra
 MS – Ministério da Saúde
 NIAID – *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas)
 NIH – *National Institute of Health* (Instituto Nacional de Saúde)

ORF – *Open Reading Frame* (fase de leitura aberta)
OSBL – *Outside Battery Limits* (custos fora do processo)
PAHO ou OPAS – *Pan American Health Organization* (Organização Pan-Americana de Saúde)
PAL - *Personnel Air Lock* (antecâmaras de entrada ou saída de pessoas)
PPV ou VLP - partículas pseudo virais (*virus like particle*)
QPN – Quantidade de Produto no ponto de Nivelamento
SBPPC – Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica
SPF – *Specific Pathogen Free* (livres de patógenos específicos)
SV – Suspensão viral
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TIR – Taxa Interna de Retorno
TMA – Taxa Mínima de Atratividade
TR – Tempo de Retorno
UNICEF – *United Nations Children's Fund* (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
VFA – Vacina de Febre Amarela
VPL – Valor Presente Líquido
WAP - *Weighted Average Price* (preço médio ponderado)
WHO ou OMS – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)
YEL-AND ou DNV – *Yellow Fever Vaccine Associated Neurologic Disease* (Doença Neurológica associada a vacina de Febre Amarela)
YEL-AVD ou DVV – *Yellow Fever Vaccine Associated Viscerotropic Disease* (Doença Viscerotrópica associada à vacina de Febre Amarela)

Capítulo 1 – Introdução

A febre amarela é uma doença conhecida mundialmente pela sua alta letalidade, podendo levar à morte de 10% dos indivíduos não vacinados que forem infectados pelo vírus. Sua transmissão pode acontecer através de picadas de mosquitos infectados, como por exemplo, o *Aedes aegypti*, conhecido também por transmitir outras doenças como dengue, chikungunya e zika em ambiente urbano. A transmissão acontece quando uma pessoa não vacinada contra febre amarela é picada por um mosquito infectado, passando a partir deste momento a ser uma fonte de infecção. O maior número de casos se encontra em países tropicais e subtropicais, com problemas de saúde pública, como países da África e das Américas do Sul e Central. Nos últimos anos, foi observado um aumento alarmante desses números de casos, com surtos em diversas partes do mundo, tornando possível sua disseminação por países não endêmicos (WHOa, 2016).

O combate ao vetor da doença - o mosquito - é uma importante medida de controle da transmissão, mas a vacinação é a única forma de prevenção da doença (WHOa, 2016). Atualmente, as vacinas disponíveis são compostas do vírus vivo atenuado, produzidos em ovos embrionados de galinha. Embora seja um processo simples e relativamente barato, existem alguns problemas associados à sua fabricação que dificultam um aumento de escala e uma rápida resposta em situações de epidemia, mostrando a necessidade de desenvolvimento de uma tecnologia alternativa. Um processo baseado em biorreatores e processos avançados de purificação, com a produção do vírus em linhagens contínuas de células, permitiria uma maior flexibilidade do processo, facilitando o aumento da escala. Além disto, eliminaria a necessidade de ovos livres de patógenos, um insumo de oferta limitada e que pode causar reações anafiláticas em indivíduos com alergia a proteínas do ovo (Pato, 2015).

Outros raros eventos adversos graves associados à vacinação estão relacionados à possibilidade de desenvolvimento de doenças a partir do vírus atenuado em determinadas subpopulações, o que leva à necessidade de desenvolvimento de uma vacina inativada ou de subunidade, em substituição a vacina atenuada atual (WHOa, 2016).

Diante dos problemas apresentados acima, Bio-Manguinhos/Fiocruz e o Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC/COPPE/UFRJ) desenvolveram conjuntamente um projeto de pesquisa de uma vacina purificada e inativada contra febre amarela, com produção do vírus em células Vero, utilizando biorreatores agitados sob condições isentas de compostos de origem animal.

Inserido neste contexto, este trabalho foi realizado para verificar a viabilidade econômica da implantação da plataforma tecnológica proposta como resultados dessas pesquisas. Para isto, foi proposto uma demanda para a vacina inativada, realizado um estudo de ampliação de escala e dimensionada uma planta produtiva. Este estudo será essencial para analisar se é viável continuar a investir nesta direção.

O texto da monografia está organizado em sete capítulos. Além deste capítulo, o Capítulo 2 contém uma revisão bibliográfica, em que são apresentados os trabalhos de pesquisa realizados recentemente e questões gerais sobre febre amarela e vacinas. No Capítulo 3, são apresentados os objetivos gerais e específicos. A metodologia para a análise mercado é apresentada no Capítulo 4. O detalhamento da planta, incluindo o desenho da mesma e o dimensionamento dos equipamentos são discutidos no Capítulo 5. No Capítulo 6, são apresentados a metodologia e os resultados da análise de viabilidade econômica da planta e os estudos sensibilidade para algumas variáveis. As conclusões e sugestões para estudos futuros são descritos no Capítulo 7.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1. A doença amarela

2.1.1. Aspectos Clínicos

A febre amarela é uma doença infecciosa viral aguda, não contagiosa, de curta duração, que apresenta gravidade variável. É transmitida por meio da picada de mosquitos hematófagos infectados e sua taxa de letalidade é de 5 a 10%, podendo chegar a 20-60% entre os casos mais graves (SVS, 2004; Monath, 2015). A Figura 1 apresenta as manifestações clínicas da doença, com os respectivos percentuais.

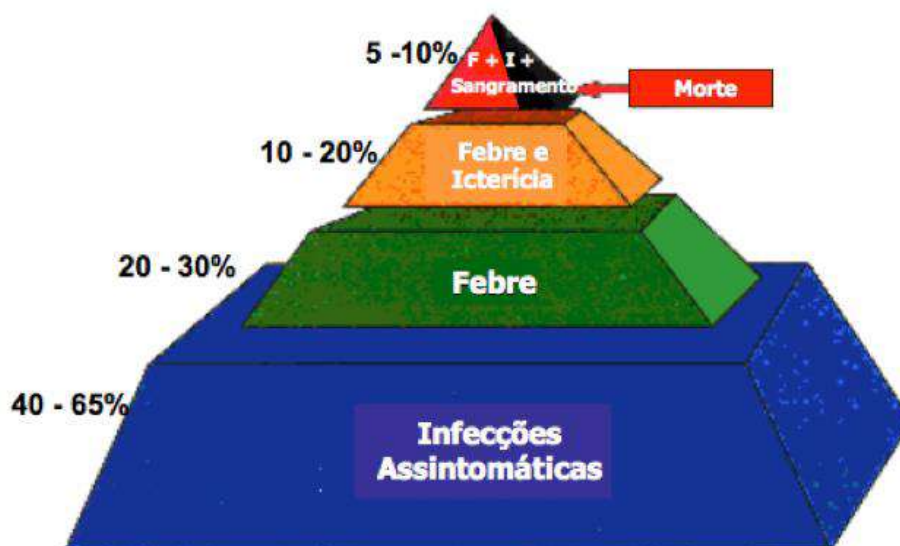


Figura 1 - Pirâmide de Febre Amarela: manifestações clínicas.

Fonte: Manual de Vigilância Epidemiológica da SVS, 2004.

A apresentação dos sintomas da doença pode ocorrer depois de um período de incubação de 3 a 6 dias (WHOa, 2016) em dois períodos distintos. O período de infecção dura cerca de 3 dias, com sintomas gerais como febre, calafrios, náuseas, vômitos, cefalalgia, lombalgia, mialgias generalizadas e prostração, seguidos de uma aparente remissão de no máximo 2 dias. Os casos leves a moderados não ultrapassam essa fase. O

período toxêmico se caracteriza pelo reaparecimento de febre, diarreia e vômitos com aspecto de borra de café, além da instalação do quadro grave de insuficiência hepatorenal, representado por icterícia, oligúria, anúria, albuminúria, hemorragias, obnubilação física e mental, progredindo para coma e morte (MS, 2009). Metade dos pacientes que entram na fase toxêmica morrem dentro de 07 a 10 dias (WHOa, 2016).

A febre amarela é detectada com dificuldade, especialmente em sua fase inicial, podendo ser confundida com diversas outras doenças. O diagnóstico pode ser feito através de exame de sangue, onde consegue-se detectar os anticorpos do vírus, produzidos em resposta a infecção (WHOa, 2016).

Não existe tratamento específico para a doença amarílica, apenas para seus sintomas. O paciente requer uma cuidadosa assistência, sob hospitalização, devendo permanecer em repouso, com reposição de líquidos e de sangue, quando indicado. Nas formas graves, o paciente deve ser atendido em uma unidade de terapia intensiva, para reduzir as complicações e o risco de óbito (MS, 2009).

2.1.2. O agente

A doença da febre amarela é causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Esse gênero de vírus também é responsável por diversas outras doenças mundialmente conhecidas, como dengue, encefalite japonesa e febre do Nilo ocidental (Gardner e Ryman, 2010).

O patógeno contém uma fita simples de RNA não segmentado, com aproximadamente 11 kilobases de comprimento e polaridade positiva, envolvida em uma cápsula de aproximadamente 50 nm de diâmetro (Gardner e Ryman, 2010). Uma representação do vírus pode ser vista na Figura 2.

Seu genoma possui uma única região codificante (ORF – *open reading frame*), região que desempenha o papel de expressão do vírus e é rodeada por duas regiões não

codificantes, responsáveis pelo importante papel de regular a expressão do vírus (Monath et al, 2013).

A ORF codifica uma poliproteína que, após clivagens por proteases, origina dez proteínas, sendo três estruturais (C, prM/M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5). As proteínas estruturais participam da formação básica da estrutura da partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade (Monath *et al*, 2013).

A proteína estrutural C forma o capsídeo, protegendo o genoma e formando um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica. Rodeando esse capsídeo, existe uma camada bilipídica, conhecida como envelope, constituída das proteínas prM/M e E (Gardner e Ryman, 2010).

Em sua forma imatura, as proteínas prM e E estão associadas, formando um heterodímero. Porém quando a partícula viral torna-se madura, ocorre a clivagem da prM, originando a proteína M e assim o heterodímero é desestabilizado e o homodímero de proteína E é formado. Com isso o vírus adquire capacidade de indução da fusão celular, aglutinação de eritrócitos e infecção eficiente das células suscetíveis (Gardner e Ryman, 2010).

A proteína E contém determinantes com funções biológicas distintas, incluindo hemaglutinação e neutralização, ligação a receptores celulares e mediação do processo de endocitose nas células hospedeiras. Por conta disso, a proteína E inicia a maior resposta imunológica, tornando-a um dos principais alvos dos anticorpos induzidos in vivo (Monath *et al*, 2013).

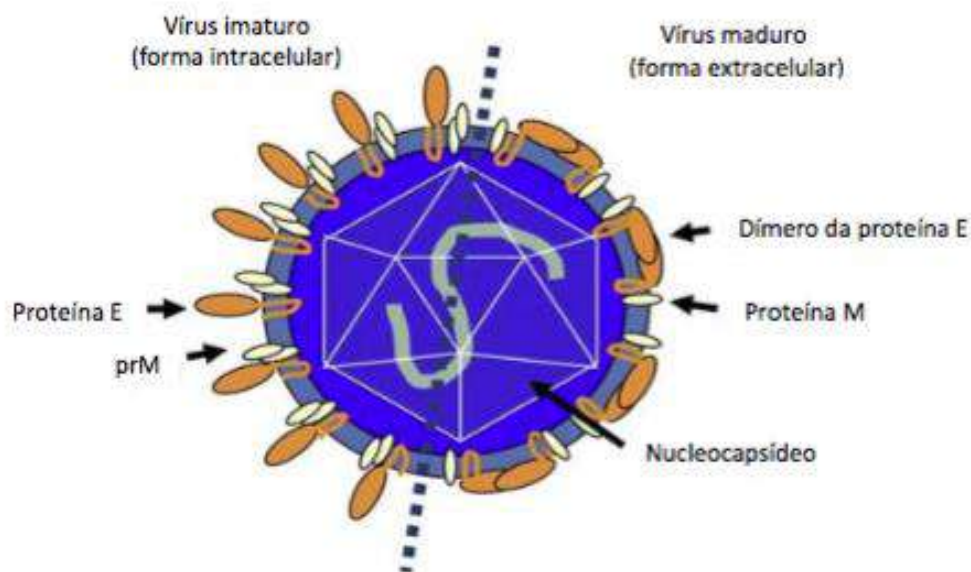


Figura 2 - Organização estrutural do vírus da febre amarela em sua forma intracelular imatura (lado esquerdo) e extracelular madura (lado direito). Adaptado de Gardner e Ryman, 2010.

2.1.3. Hospedeiro, vetor e transmissão

O vírus da febre amarela é um arbovírus, isto é, é transmitido por vetores artrópodes, através da picada dos mosquitos infectados. Os mosquitos são considerados os verdadeiros reservatórios do vírus, sendo somente transmitido pelas fêmeas com a troca sanguínea de sua picada, completando o ciclo gonotrófico, ou transferindo o vírus para sua prole. Uma vez infectados, os mosquitos permanecem assim por todo seu pequeno ciclo de vida. Não há transmissão direta de pessoa a pessoa, ou seja, é não contagiosa (MS, 2009).

Existem três classificações de transmissão do vírus, com suas espécies de vetores transmissores atrelados a cada tipo: o ciclo silvestre, de savana e urbano (Huang, 2014). Os ciclos são esquematizados na Figura 3.

No ciclo silvestre os primatas não humanos são os principais hospedeiros e amplificadores do vírus. Os vetores são mosquitos com hábitos estritamente silvestres, sendo os gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* os mais importantes na América Latina e o *Aedes africanus* na África (MSa, 2014). No Brasil, a espécie *H. janthinomys* destaca-se na

transmissão silvestre, embora a *H. leucocelaenus* tenha ganhado importância na última década. Outras espécies já foram encontradas naturalmente infectadas com vírus da febre amarela e possivelmente participam de forma secundária na transmissão, tais como: *H. albomaculatus*, *S. glaucodaemon*, *S. chloropterus*, *S. cyaneus*, *S. soperi*. Algumas espécies documentadas com infecção pelo vírus, como *Ae. serratus*, *Ae. scapularis* e *Psorophora ferox*, necessitam de mais estudos para definir a sua importância na epidemiologia da doença (MSa, 2014).

O ciclo intermediário ou de savana acontece somente na África, onde as espécies *Ae. africanus*, *Ae. bromeliae*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. metallicus*, *Ae. opek*, *Ae. taylori*, *Ae. vittatus*, *Ae. simpsoni*, e *Ae. kenysensis*, transmitem o vírus para humanos e primatas não-humanos (Huang *et al*, 2014).

O ser humano participa na transmissão do vírus como um hospedeiro acidental, trazendo o vírus para um cenário urbano. Nesse ciclo urbano o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica, ocorrendo a partir da picada do *Aedes aegypti* (MSa, 2014) na África e América do Sul. Este é o vetor mais importante, pois está bem adaptado para ambientes domésticos humanos, picando durante o dia, de modo que os mosquiteiros e inseticidas oferecem pouca proteção. Ele se reproduz em recipientes de armazenamento de água e em pequenos volumes de água em recipientes descartados como recipientes plásticos, latas e pneus. Não sendo totalmente dependente das chuvas, é capaz de sobreviver em áreas relativamente secas (WHO, 2013).

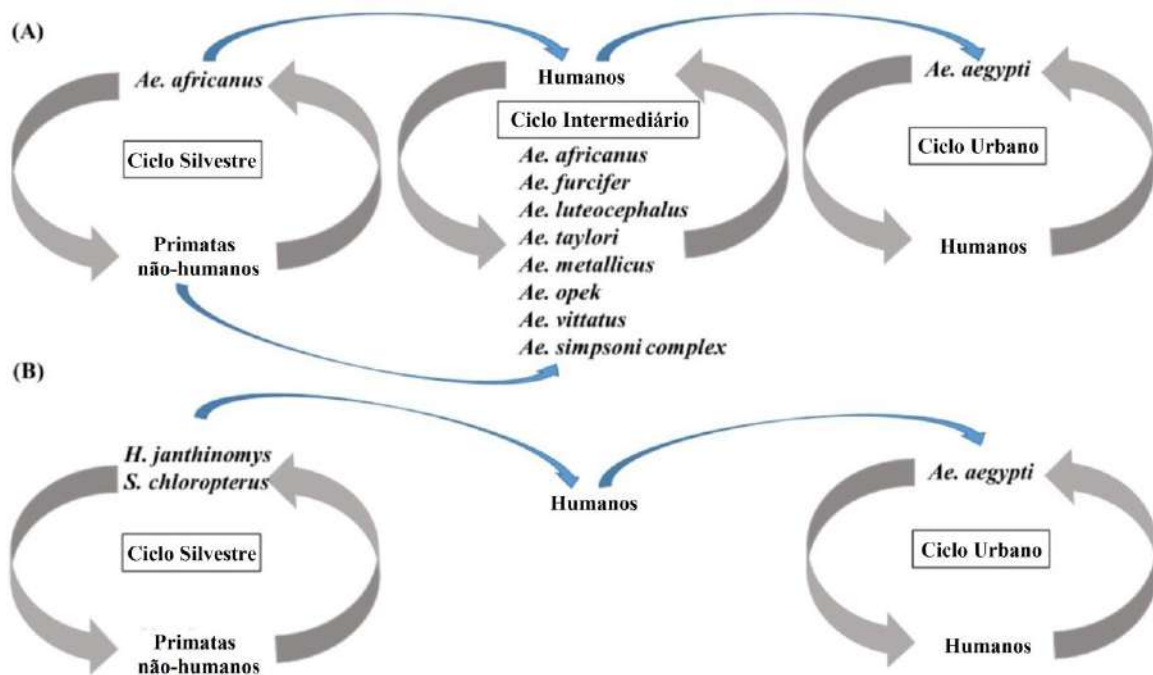


Figura 3 - O ciclo de transmissão do vírus de febre amarela na África (A) e América do Sul (B). Adaptado de Huang *et al*, 2014.

2.1.4. Epidemiologia

Há uma estimativa de 200.000 casos de febre amarela, causando de 29 a 60 mil mortes, em todo o mundo a cada ano. (WHOa; WHOc, 2016) A disseminação do vírus da febre amarela ocorre em cerca de 47 países endêmicos nas regiões tropicais da África e da América Latina. Aproximadamente 90% dos casos notificados a cada ano ocorrem na África Subsaariana (WHOd, 2016).

Na África, as regiões tropical e subtropical são áreas endêmicas (Figura 4), onde os surtos ocorrem com maior frequência na África Ocidental. Há uma periodicidade da atividade da febre amarela, com sua ascensão em intervalos muito irregulares de 5-20 anos na África Ocidental e intervalos mais longos, de por exemplo, 45 anos em partes da África Oriental. Os casos de febre amarela são raros na África Central (Monath e Vasconcelos, 2015).



Figura 4 - Mapa de Risco de Febre Amarela na África.
Adaptado de CDC, 2017.

Na última década, a atividade epidêmica de febre amarela na África ocorreu em Burkina Faso (2004), Costa do Marfim (2001-2003), Etiópia (2013), Gana (2003), Guiné (2000-2001, 2005), Libéria (2000- 2001, 2004), Mali (2004), Senegal (2002-2003, 2006), Sudão (2003, 2005, 2012-2013), Togo (2006), Uganda (2010 e 2016), República Centro Africano (2008), Chade (2008), e mais recentemente Angola (2015-2016), República Democrática do Congo (2008 e 2016) e Quênia (2016) (Monath e Vasconcelos, 2015; WHOe, 2016).

Em 2016, o surto de epidemia de febre amarela na África registrou 3.294 casos suspeitos, 861 casos confirmados e 347 mortes. O surto começou em Luanda, capital da Angola, e depois foi disseminada para outros países. A saber: República Democrática do Congo (1106 casos suspeitos, 68 confirmados e 75 mortes), Uganda (68 casos suspeitos), Quênia (2 casos confirmados) e China (11 casos confirmados) (WHOf, 2017).

Na última década, casos de febre amarela foram notificados nas Américas nos seguintes países: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela (PAHO, 2016). As regiões endêmicas da América do Sul podem ser vistas na Figura 5.



Figura 5 - Mapa de Risco de Febre Amarela na América do Sul.
Adaptado de CDC, 2017.

No Brasil, não há registro de transmissão da febre amarela pelo *Aedes aegypti* (ciclo urbano) desde 1942. Os casos confirmados posteriores a 1942 são resultado de transmissão silvestre. Os focos endêmicos até 1999 estavam situados nos estados das regiões Norte,

Centro-Oeste e área pré-amazônica do Maranhão, além de registros esporádicos na parte oeste de Minas Gerais (MSa, 2014).

A Figura 6 mostra a série histórica do número de casos, com sua taxa de mortalidade, desde 1980 no Brasil.

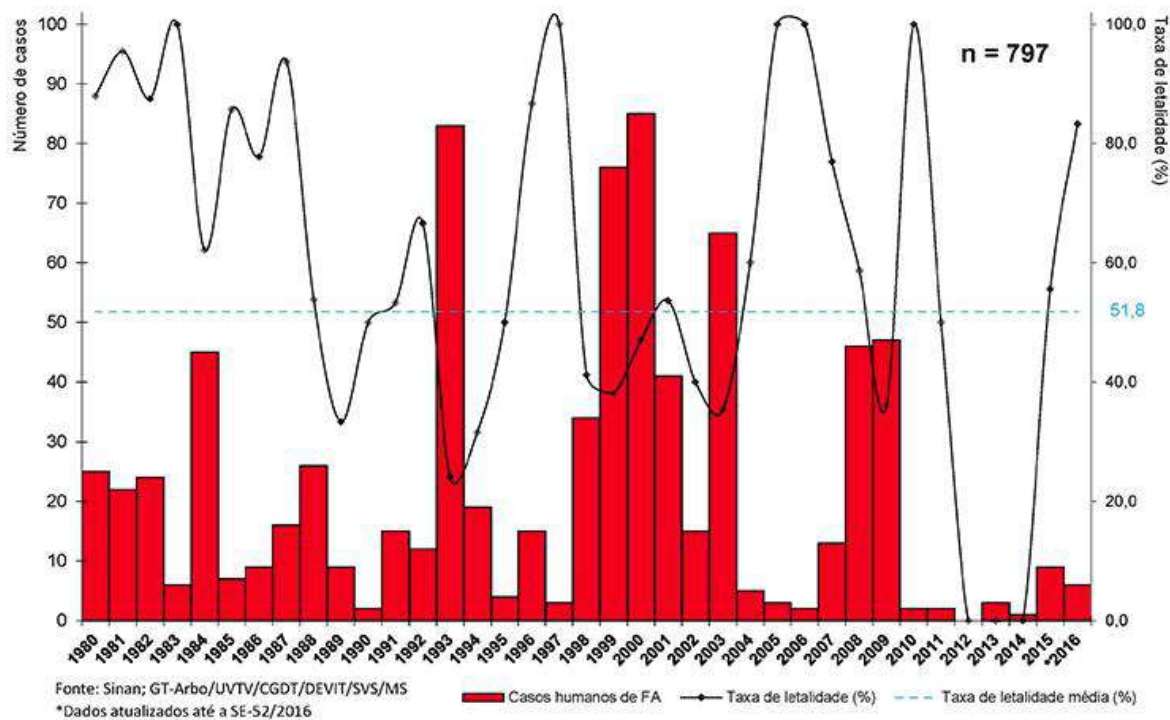


Figura 6 - Série histórica de casos humanos confirmados de febre amarela e taxas de letalidade, Brasil, 1980-2016.

Fonte: SVS, 2016.

Entre 2000 e 2008, observou-se uma expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país, detectada em áreas classificadas há várias décadas como silenciosas. Em 2008, procedeu-se a uma nova delimitação, a qual levou em conta vários fatores: evidências da circulação viral, ecossistemas (bacias hidrográficas, vegetação), corredores ecológicos, trânsito de pessoas, tráfico de animais silvestres e critérios de ordem operacional e organização da rede de serviços de saúde que facilitassem procedimentos operacionais e logísticos nos municípios (MSa, 2014).

Em 2014, o Brasil declarou o ressurgimento do vírus da febre amarela no país devido a epizootias em primatas não humanos em que foi confirmada a presença do vírus. Até 2015, sete casos foram confirmados, incluindo quatro mortes. (PAHO, 2016).

No começo de 2017, iniciou-se o maior surto das últimas décadas no Brasil, envolvendo principalmente os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, mas chegando a alcançar locais de regiões não-endêmicas. De acordo com a última atualização do Ministério da Saúde, em maio de 2017, foram confirmados 792 casos da doença no Brasil. Ao todo, foram registrados 3.240 casos suspeitos, sendo que 519 permanecem em investigação e 1.929 foram descartados. Dos 435 óbitos notificados, 274 foram confirmados, 37 ainda são investigados e 124 foram descartados, gerando um índice de 34,5% de letalidade (MS, 2017).

Uma preocupação séria para o futuro é de a Febre Amarela ser introduzida, por um viajante infectado, em áreas fora da zona endêmica que tem a presença do *Aedes aegypti*, particularmente Índia e Sudeste Asiático. Essa ameaça pôde ser ilustrada pelos 11 casos confirmados da doença na China em 2016 e pela recente propagação do vírus da Chikungunya, transmitido pelo *Aedes aegypti*, em ilhas do Oceano Índico, Índia, Europa do Sul, e no Caribe. Embora a OMS (Organização Mundial de Saúde) mantenha um estoque para vacinação de emergência, um extenso surto pode criar um déficit significativo no fornecimento de vacina (Monath e Vasconcelos, 2015), como aconteceu em 2016 na África e em 2017 no Brasil.

2.2. A vacina amarílica

Uma vez contraída, a Febre Amarela não possui tratamento, agindo de maneira muito rápida, com difícil detecção e alta taxa de mortalidade entre os casos mais graves. A vacina amarílica é o único método de prevenção e controle da doença.

2.2.1. História

Na década de 1930, a vacina de febre amarela atenuada foi desenvolvida por duas vertentes distintas. A primeira foi feita a partir de uma cepa isolada em 1927 no Senegal, contando com a colaboração entre o Instituto Pasteur e a Escola de Medicina de Harvard. A atenuação foi feita através de 128 passagens em tecido cerebral de camundongos. Essa vacina foi principalmente utilizada em países de língua francesa da África ocidental em campanhas de imunização obrigatórias. Mesmo com uma diminuição significativa dos casos da doença, a vacina foi descontinuada em 1980 devido a efeitos adversos pós-vacinação (Gardner e Ryman, 2010).

Em 1937, outra vacina de febre amarela foi desenvolvida por Theiler e Smith, na Fundação Rockefeller. O vírus foi isolado de um macaco *Rhesus* que foi inoculado com o sangue de um paciente africano. O sangue do macaco que apresentou sintomas da doença foi inoculado novamente e assim feitas 52 novas sucessivas passagens em cultura de células, estabelecendo a atenuação da cepa Asibi, que recebeu o nome do paciente (Souza, 2007; Gardner e Ryman, 2010).

Uma das cepas mais utilizadas até hoje na produção da vacina, 17D, foi originada após 18 passagens sucessivas em tecido embrionário de camundongo, seguidas de 58 passagens em tecido embrionário de galinha e 128 passagens em tecido embrionário de galinha após remoção de cérebro e medula espinhal. A partir desta cepa, foram então obtidas duas subculturas: a linhagem 17DD, derivada da 195ª passagem, utilizada no Brasil e a linhagem 17D-204, originada da passagem 204, sendo utilizada pelos demais produtores mundiais da vacina amarílica (Monath *et al*, 2013).

Para que não houvesse muitas mutações na linhagem e a vacina se tornasse ineficiente, foi estabelecido um sistema de lotes semente do vírus em 1945. Assim as cepas ainda apresentariam boa imunogenicidade e atenuação em sua virulência, e seriam

controladas pelo atendimento as normas da Organização Mundial de Saúde (OMS), que limitaram o número de passagens possíveis na produção do imunobiológico (Souza 2007; Gardner e Ryman, 2010).

A vacina amarílica foi distribuída em diversos países do mundo, atingindo mais de 500 milhões de pessoas, sendo considerada uma das vacinas mais eficientes e seguras já desenvolvidas, conferindo imunidade a longo prazo. Apesar disso, foi-se notando um aumento de casos reportados de graves efeitos adversos pós-vacinação, gerando a discussão entre o risco e benefício da vacinação (Hayes, 2010).

2.2.2. Efeitos adversos

Apesar das reações pós-vacinação do vírus amarílico atenuado serem raras, com o aumento do número de vacinações e das notificações de eventos adversos graves, devido às melhorias na farmacovigilância, foi iniciada a discussão entre o risco e o benefício da vacinação (Monath, 2012).

Os efeitos adversos podem ser consequência da injeção de microrganismos vivos em um indivíduo que, por susceptibilidade imunológica, não consegue controlar a proliferação do vírus. (Hayes, 2010).

Em geral, o risco de acontecimento de qualquer evento adverso grave após a vacinação é de aproximadamente de 4,7 casos por 100.000 habitantes. Essa taxa de incidência é ainda maior entre indivíduos acima de 60 anos, sendo de 8,3 casos por 100 mil habitantes (Hayes, 2010).

Os principais eventos adversos relatados são:

(1) Doença Viscerotrópica associada à vacina de Febre Amarela (YEL-AVD ou DVV) – Muito similar à febre amarela do tipo selvagem, com similar taxa de mortalidade, podendo causar falha do sistema de múltiplos órgãos. Reportada pela primeira vez no ano de 2001, mas com indícios de ocorrência desde 1973. Nos EUA, e possivelmente na África,

0,4 em 100 mil doses de vacina aplicada resultam na YEL-AVD. No Peru a incidência foi de 7,9 por 100 mil doses em 2009 (Monath *et al*, 2010).

(2) Reações anafiláticas - ocorre a uma frequência de cerca de 1,8 por 100 mil doses e é atribuído principalmente a alergia de proteínas de ovos ou de gelatina utilizados na produção de vacinas (Monath *et al*, 2010).

(3) Doença Neurológica associada a vacina de Febre Amarela (YEL-AND ou DNV) - Pode se manifestar como encefalite, meningite, neuropatia, síndrome de Guillain-Barre, encefalomielite disseminada aguda, ou mielite espinal. A taxa de letalidade de YEL-AND parece ser relativamente baixa, com estimativas de frequência variando de 0,4 a 9,9 por 100 mil doses aplicadas, dependendo da definição de estudo e caso usado (Monath *et al*, 2010).

Com base nestes dados se conclui que os benefícios da vacina atenuada são maiores que seu risco quando a utilização se dá de forma preventiva nos países endêmicos e se excluem os grupos potenciais para a ocorrência de eventos adversos. Entretanto, para a utilização em turistas que adentram estas mesmas áreas, o risco é maior que o benefício, já que a probabilidade de contaminação é estimada em 5 por 100.000 viajantes, em um período de duas semanas de viagem (Hayes, 2010 e Monath, 2012).

A maioria dos efeitos colaterais é relacionada com a possibilidade de replicação do vírus 17D utilizado na vacina distribuída pelo mundo. O desenvolvimento de uma vacina inativada, de subunidade ou VLP, seria uma alternativa viável para evitar os efeitos adversos graves e possibilitar a vacinação de grupos de maior risco e de pessoas com alergias (Hayes, 2010; Monath *et al*, 2010).

2.2.3. Demanda e suprimento

As atividades de imunização são divididas em três categorias: vacinação de rotina, campanhas de prevenção e resposta a surtos. Durante a última década, a demanda de vacina de febre amarela aumentou substancialmente considerando todas as atividades de imunização. Nos anos anteriores a 2000, a média anual era de 5 milhões de doses, enquanto que desde 2007, a média anual tem sido de cerca de 34 milhões de doses por ano (UNICEF, 2016).

O crescimento da demanda ao longo dos anos se dá através do apoio da GAVI (Aliança Global de Vacinas e Imunizações), na realização de campanhas de vacinação preventiva em massa, no estoque estratégico para resposta de emergência e na criação de um número de programas de vacinação de rotina em países de alto risco. Uma vez que campanhas preventivas em diversos países africanos endêmicos forem concluídas, a pressão sobre a oferta da vacina diminuirá, de modo que a capacidade de produção atual será suficiente para cobrir as necessidades dos programas de vacinação de rotina e quaisquer eventuais surtos (UNICEF, 2016).

A previsão de demanda total para UNICEF (Figura 7) de todas as atividades de vacinação nos países endêmicos até 2017 é de uma média de 54,5 milhões de doses por ano, e excede a disponibilidade oferecida pelos fabricantes em aproximadamente 10%. A Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) prevê demanda de aproximadamente 15 milhões de doses por ano para as Américas, além das doses para UNICEF, colocando uma maior pressão sobre o equilíbrio da oferta global e demanda (UNICEF, 2016).

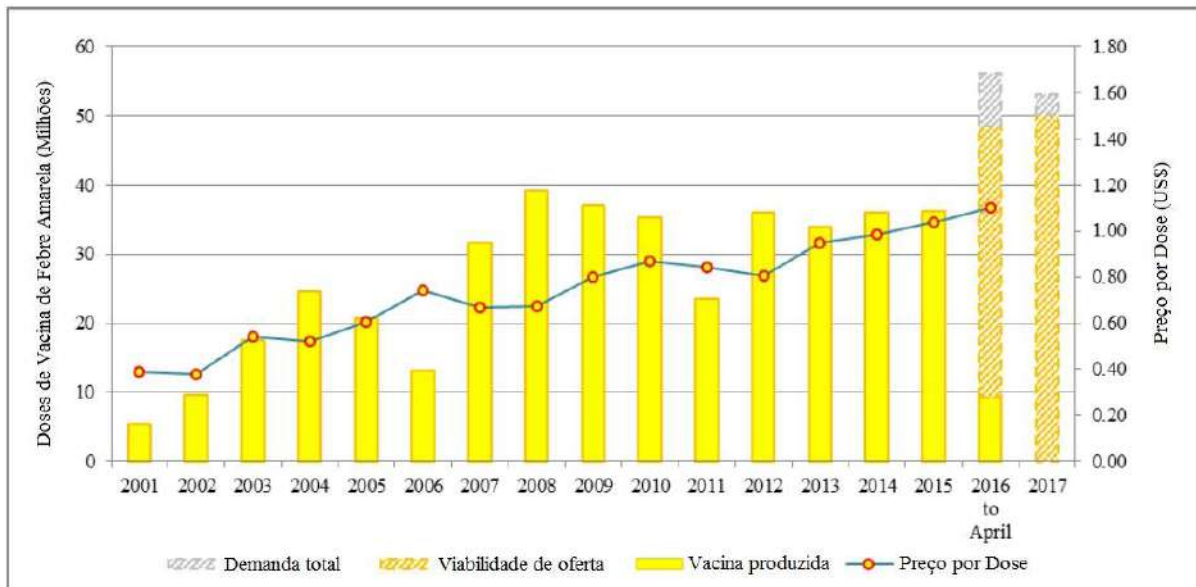


Figura 7 - Fornecimento de vacina de Febre Amarela pela UNICEF e previsão de demanda até 2017. Adaptado de UNICEF, 2016.

Em documentos anteriores, a UNICEF tinha previsto uma demanda ainda maior, chegando a 64 milhões de doses em 2015 e uma diferença entre demanda e oferta de 44% em 2013 (UNICEF, 2013; UNICEF, 2015). Mesmo assim, a UNICEF não prevê a entrada de eventuais novos fabricantes no mercado para a vacina de febre amarela no futuro próximo, permanecendo com os fabricantes pré-qualificados da OMS: Bio-Manguinhos (Fiocruz/Brasil), FSUE Chumakov (Rússia), Institute Pasteur de Dakar (Senegal), Sanofi Pasteur (França) (UNICEF, 2016).

A fabricação da vacina de febre amarela depende atualmente da disponibilidade e fornecimento de ovo livre de patógeno (SPF), em que as células primárias de embrião de galinha são utilizadas para a produção da vacina. Essa disponibilidade é um limitante da produção, por isso vários fabricantes têm feito investimentos para garantir maior capacidade de produção (UNICEF, 2016).

Uma alternativa para as limitações do suprimento mundial é o projeto de Bio-Manguinhos, que visa o desenvolvimento de uma vacina inativada produzida a partir de células Vero em biorreatores agitados. Isso possibilita o aumento da capacidade produtiva e

da produtividade, diminuindo o déficit da oferta e demanda, além de permitir um rápido atendimento em casos de epidemias (Pato, 2015).

No Brasil, a vacinação é recomendada para toda população de 9 meses até 60 anos de idade, que resida ou viaje para áreas de risco de transmissão (Figura 8). Era indicado que as pessoas tomassem uma dose da vacina atenuada e após 10 anos tome uma dose reforço, porém em abril de 2017, foi adotada a dose única da vacina seguindo a recomendação da OMS, podendo se considerar protegido contra a doença para o resto da vida (MSb, 2014; Portal da Saúde, 2017a).

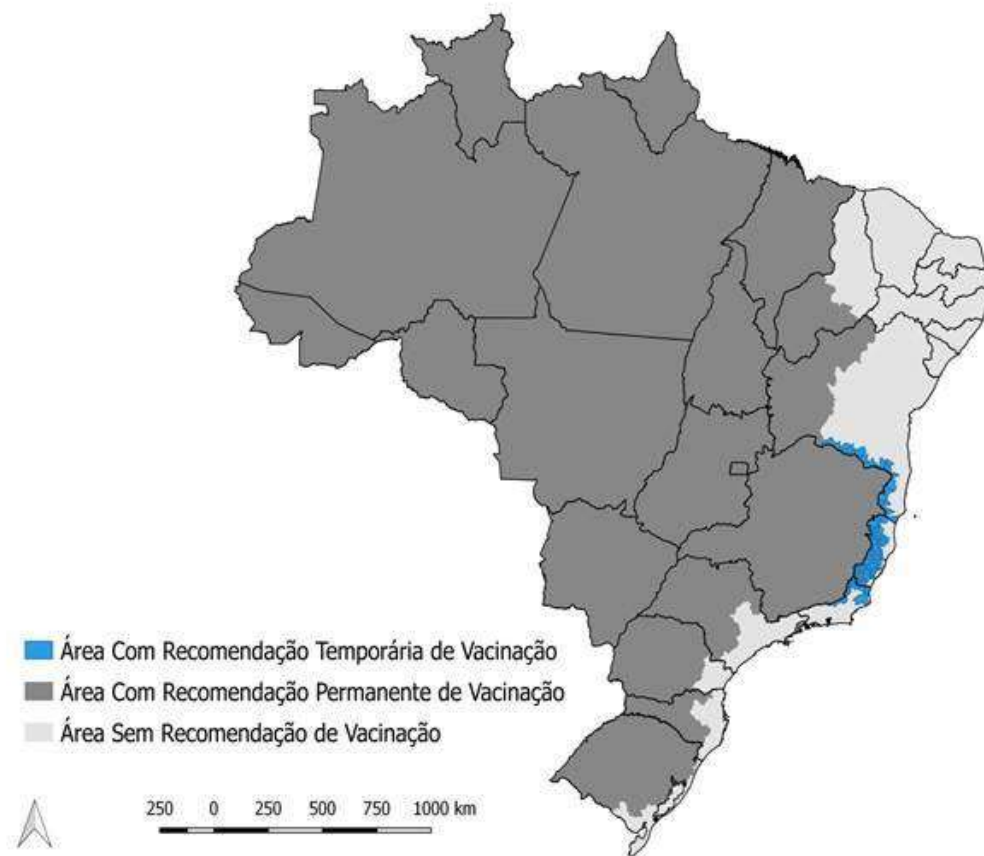


Figura 8 - Área Com e Sem Recomendação de Vacinação de Febre Amarela no Brasil, 2017.

Fonte: Portal da Saúde, 2017b.

Além da vantagem na cadeia de suprimento, o projeto de Bio-Manguinhos também pode ser uma solução para a ampliação dos critérios de vacinação. Ao utilizar uma vacina inativada, esta poderia ser aplicada a idosos e bebês menores de 9 meses por conta da diminuição da probabilidade de riscos associados. Ao não utilizar ovo de galinha, pessoas com alergia a essas proteínas também poderiam ser vacinadas.

2.2.4. Preço

O preço médio ponderado (WAP) por dose de vacina de febre amarela aumentou 7% ao ano, em média, desde 2001, de USD 0,39 para chegar a USD 1,04 em 2015 (UNICEF, 2016).

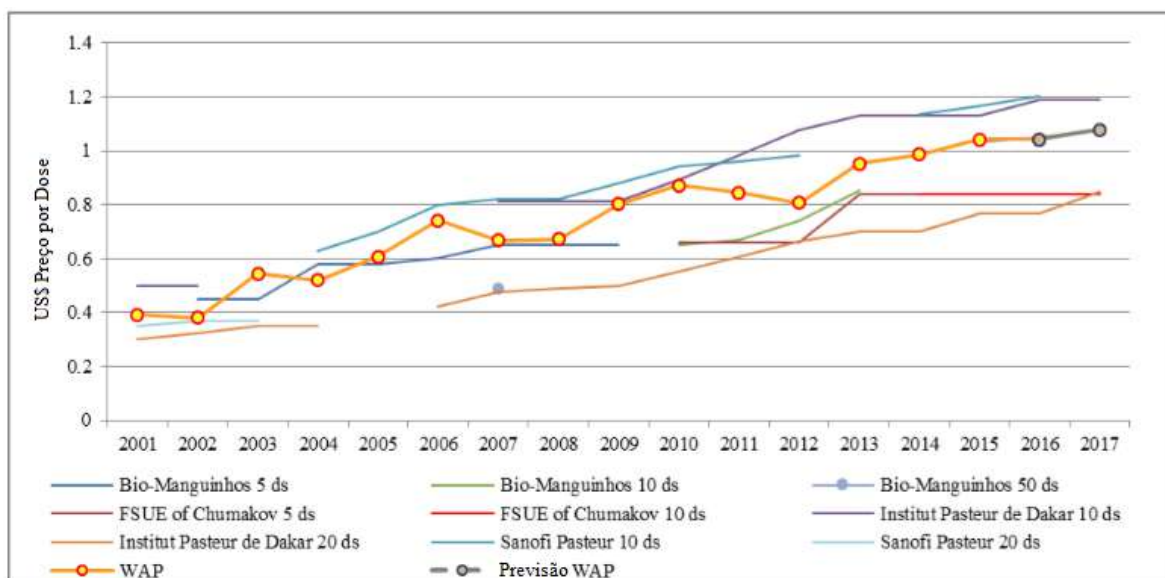


Figura 9 - Preço, em dólar americano, por dose de vacina durante os anos, com previsão de 2017. Adaptado: UNICEF, 2016.

O aumento dos custos de investimento por parte dos fornecedores para renovar instalações e a descontinuação das apresentações de 20 e 50 doses tem contribuído para essa tendência. Dadas as limitações de fornecimento, a UNICEF antecipa que o WAP por dose em curto prazo chegará a USD 1,10 (UNICEF, 2016). O preço atual da dose fornecida

por Bio-Manguinhos para a OMS é de USD 1,17, para frascos de 5 doses, e de USD 1,08, para frascos de 10 doses (UNICEF, 2017).

2.3. Processo Produtivo

2.3.1. Plataforma Tecnológica Atual

A vacina atenuada é atualmente fabricada na Fundação Oswaldo Cruz, no Laboratório de produção da vacina contra febre amarela (LAFAM) dentro do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, denominado Bio-Manguinhos (Carvalho, 2005).

A replicação do vírus atenuado é feita a partir de sua inserção em ovos de galinha recentes, férteis e livres de patógenos (SPF). Esses ovos vêm de fornecedores qualificados, sendo recebidos e inspecionados individualmente antes de irem para incubadora, onde permanecem por 9 dias antes da inoculação. Para garantir a integridade e viabilidade dos embriões, é feita uma ovoscopia, permitindo visualizar os embriões através de um feixe de luz (Carvalho, 2005).

Os embriões vivos são arrumados em posição vertical para o procedimento de inoculação, onde 2 mm de uma extremidade é carbonizada para que uma alíquota do vírus 17DD, proveniente do lote semente de trabalho, seja injetado. Em seguida, os ovos são selados e incubados por 3 dias, em condições controladas. Após esse período de incubação, são submetidos a uma nova ovoscopia.

Os embriões são coletados por meio da abertura dos ovos, feitos por anéis de carbonização para levantar a calota da casca, e são colocados em uma câmara de trituração junto com um diluente. Em seguida o material é centrifugado, originando um resíduo sólido correspondente a cerca de 40% do volume inicial. O sobrenadante da centrifugação é aspirado para um frasco de armazenamento e é estabilizado. São retiradas, de cada frasco,

amostras em duplicata para testes de potência, de esterilidade (bactérias e fungos) e detecção de *Mycobacterium tuberculosis*. Após identificação do lote, a suspensão viral é congelada, permanecendo à -70°C, aguardando os resultados dos controles microbiológicos (Carvalho, 2005).

Se os resultados dos testes, feitos com as amostras dos frascos, forem insatisfatórios, os frascos correspondentes são descartados. Se os resultados forem satisfatórios, os frascos são mantidos em baixa temperatura (-70 °C) até o momento de sua utilização na preparação de um lote de vacina (Carvalho, 2005). Os testes de controle de qualidade demoram em média 60 dias para a liberação da vacina para processamento final; dentre esses, 40 dias são para o teste de micoplasma (Barbosa, informação pessoal).

O maior problema associado a essa plataforma tecnológica, além do fato de ainda ser produzida a partir de animal, é de ter sua produção rudimentar, quase “artesanal”, com uma grande quantidade de ovos a serem inoculados um a um, com alto risco de contaminação (Barbosa, informação pessoal).

2.3.2. Plataforma Tecnológica Proposta

O Instituto de Bio-Manguinhos tem feito alguns estudos diferentes para mudança de seu processo produtivo para atingir uma vacina que seja mais segura ou tão quanto a vacina atual, sendo também sua fabricação mais produtiva. Assim terá maiores possibilidades de atingir o mercado nacional e internacional.

No momento o instituto possui dois projetos, ambos em estágio de avaliação não clínica. Um deles visa à obtenção de uma vacina de subunidade recombinante, sendo desenvolvida em parceria com a Fraunhofer, uma instituição alemã, com base nos Estados Unidos. A avaliação não clínica deste projeto resultou em 100% de proteção dos camundongos imunizados com o vetor construído (Pato, 2015).

O outro projeto de Bio-Manguinhos visa à produção de uma vacina amarílica inativada, com produção do vírus em células Vero, em biorreatores agitados, para posterior purificação e inativação. Para desenvolvimento também de uma vacina inativada, a Xcellerex (GE) conduz um projeto em plataforma similar, com processos de produção, purificação, inativação viral e formulação definidos, tendo sua fase I de estudos clínicos realizada em 2011 (Monath *et al*, 2011).

Seguindo as referências e informações coletadas, esta monografia tem como seu propósito se voltar ao novo processo produtivo proposto por Bio-Manguinhos para a fabricação de uma vacina inativada de febre amarela feita a partir de cultivo em células Vero. A plataforma proposta será demonstrada no capítulo 5 desta monografia.

O diagrama de blocos apresentado na Figura 10 demonstra o processo produtivo atual (a) e ao lado, o processo produtivo proposto de vacina inativada (b). Ao analisar apenas as etapas de fabricação da vacina de febre amarela, não considerando o tempo dos testes do controle de qualidade, podemos observar que, apesar de mais simples tecnologicamente, a produção atual da vacina demora no mínimo 12 dias, enquanto que a tecnologia proposta demoraria 7 dias para obtenção do IFA.

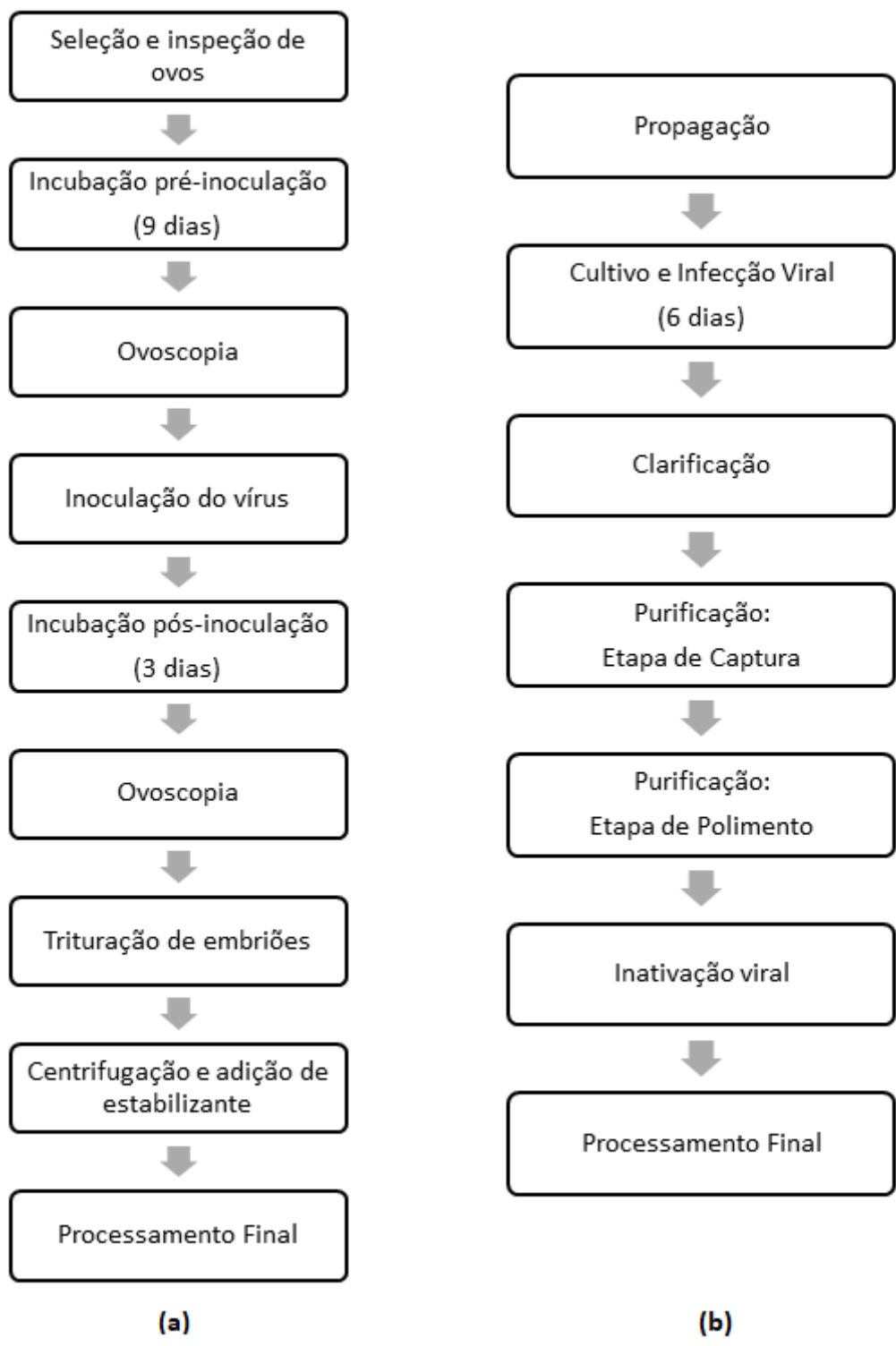


Figura 10 - Comparação entre os processos de produção de vacina atenuada (plataforma atual) e a vacina inativada (plataforma proposta).

Adaptado de Pato, 2015

2.4. Desenvolvimento do Imunobiológico e Aspectos Regulatórios

O desenvolvimento de um imunológico requer longos estudos, distribuídos em diferentes fases, precisando ser aceitos pela agência regulatória (ANVISA no Brasil) antes do produto ser comercializado. Se os resultados dos estudos não forem satisfatórios em certa etapa, o estudo é finalizado sem avançar para a etapa seguinte.

Após o desenvolvimento do imunobiológico e a realização dos testes analíticos para sua caracterização e verificação da eficácia *in vitro*, a primeira fase de testes de segurança e eficácia *in vivo* são feitos em animais, denominados estudos pré-clínicos ou não clínicos. Estes testes são feitos para verificar o comportamento da substância dentro de um organismo (SBPPC, 2017). Nenhum paciente humano é utilizado, mas existe um alto custo com os animais utilizados.

Os estudos clínicos são testes feitos em humanos, divididos em 4 fases:

- **Fase I:** tem seu principal objetivo avaliar a segurança do produto e a habilidade de gerar uma resposta imune. A medicação é testada em pequenos grupos de até 100 pessoas, geralmente, de voluntários sadios (SBPPC, 2017).
- **Fase II:** tem o objetivo de monitorar a segurança da vacina, resposta imune, verificar potenciais efeitos colaterais e eficácia preliminar contra infecção e doença clínica. Com isso seria possível determinar a dosagem, número de doses, intervalo de tempo entre doses e rota de administração da vacina (WHOg, 2004). O número de pacientes que participam desta fase pode ir de centenas a milhares de pessoas (SBPPC, 2017).
- **Fase III:** O novo imunobiológico é comparado com o medicamento padrão existente ou um placebo. Geralmente, os estudos desta fase são randomizados, com os pacientes divididos no grupo de controle e no grupo investigacional, que recebe a nova medicação. Além da comparação de resultados, o objetivo desta fase é avaliar a

segurança das vacinas em um grande grupo de pessoas (milhares a dezenas de milhares). Esses ensaios devem ser suficientemente grandes para garantir que a vacina funcione em condições variadas ou identificar possíveis efeitos colaterais raros que poderiam não aparecer nos grupos menores testados nas fases anteriores (Plotkin, 2008). No caso deste projeto, a vacina de febre amarela proposta tem uma de suas finalidades contornar possíveis efeitos adversos que vacinas atenuadas atuais possam causar, além de aumentar a faixa etária de vacinação. Para garantir esse aumento de segurança, é preciso considerar um número alto de pacientes.

- Registro do Produto na ANVISA: Os principais requisitos para registro de um novo imunobiológico é a apresentação do dossiê do produto, Certificado de Boas Práticas de Fabricação (CBPF) e pagamento das taxas de fiscalização sanitária para sua regularização. O dossiê é composto pela caracterização completa do produto e descrição detalhada do processo produtivo, demonstrando a consistência na manufatura do medicamento, além de evidências de segurança e eficácia mostradas por testes pré-clínicos e clínicos realizados previamente (RDC 55, 2010).
- Fase IV: Estes estudos são realizados para se confirmar que os resultados obtidos na fase anterior são aplicáveis em uma grande parte da população doente. Nesta fase, o medicamento já foi aprovado para comercialização pela agência reguladora. A vantagem dos estudos fase IV é que eles permitem acompanhar os efeitos dos medicamentos a longo prazo (SBPPC, 2017).

Os aspectos regulatórios não consistem somente do registro do produto, mas também de toda a preparação de materiais e equipamentos, do local de trabalho e produção, de treinamentos aos funcionários, precisando contemplar os requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Capítulo 3 – Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade econômica da implantação de uma planta produtiva de uma nova vacina purificada e inativada contra febre amarela, produzida em células Vero, utilizando biorreatores agitados.

3.2. Objetivos Específicos

- 1 - Analisar o mercado da vacina contra febre amarela a fim de definir a demanda para uma vacina inativada.
- 2 - Com base na demanda, definir a capacidade produtiva anual da planta.
- 3 - Propor um escalonamento do processo produtivo desenvolvido em laboratório para atender a demanda estabelecida, dimensionar os equipamentos principais e calcular o consumo de matérias-primas e de materiais de consumo do processo.
- 4 - Propor um desenho para a planta e classificações para suas áreas produtivas, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.
- 5 - Com base nos principais equipamentos e nos insumos, estimar o custo de produção, o investimento requerido para construção da planta e o investimento necessário para realizar os testes não clínicos e clínicos indispensáveis para a aprovação do produto no mercado.
- 6 - Calcular o fluxo de caixa do projeto e determinar os valores de VPL, TR e TIR como indicativos da viabilidade econômica do projeto.
- 7 - Fazer análises de sensibilidade em relação ao preço de venda do produto, à TMA e aos custos de estudos clínicos para avaliar a viabilidade econômica sob diferentes cenários.

Capítulo 4 – Análise de Mercado

Uma análise mercadológica é um estudo que orienta as decisões empresariais possibilitando (SEBRAE, 2016):

- (1) Conhecer o cliente em potencial, caracterizando-o em aspectos quantitativos (potencial do mercado) e qualitativos (estilo de vida, renda etc.);
- (2) Perceber a estratégia dos concorrentes e observar seus pontos fortes e fracos;
- (3) Analisar os fornecedores e outras empresas: sistema de vendas e distribuição, políticas de preços e cobrança; qualidade dos produtos e serviços;
- (4) Identificar o segmento mais lucrativo, detectar novas tendências, avaliar a performance de seus produtos e serviços.
- (5) Dimensionar mercado, identificar a quantidade ou volume que o mercado é capaz de absorver e a que preços esses produtos poderão ser vendidos.

A análise mercadológica realizada nesse trabalho teve como objetivo fazer a projeção da demanda de vacina inativada de febre amarela, considerando o mercado nacional e a possibilidade de exportação em um horizonte de quase 20 anos. Essa projeção foi utilizada para definir a capacidade produtiva da planta proposta.

4.1. Mercado Internacional

O surto de febre amarela ocorrido na África em 2016 causou uma grande preocupação na população. A fim de conter o ressurgimento da doença pelo mundo, foram feitas diversas campanhas de resposta à emergência, gerando um grande aumento na demanda da vacina.

No final de abril de 2016, a OMS e a UNICEF já tinham distribuído mais de 9,3 milhões de doses de vacina atenuada para essas campanhas, sendo 6 milhões do seu estoque de emergência, 2,3 milhões vindos de fundos da OMS e 1 milhão de doses por doação de um produtor (UNICEF, 2016). Em meados de 2016 esse número já tinha aumentado para 17 milhões de doses para campanhas urgentes de vacinação em massa (UNICEFb, 2016).

A UNICEF, com o apoio da GAVI Alliance (*Global Alliance for Vaccines and Immunizations* – Aliança Global para Vacinas e Imunizações), disponibiliza a vacina de febre amarela para os países endêmicos da África subsaariana. Para este fim, conta com a colaboração de 4 produtores mundiais pré-qualificados pela OMS. Bio-Manguinhos/Fiocruz é um destes produtores, que tem atualmente um fornecimento previsto para o mercado internacional de 8 milhões de doses por ano (UNICEF, 2016).

A nova epidemia mundial reforçou que a febre amarela é uma doença que não pode ser negligenciada, pois é impossível erradicá-la completamente, já que o risco da doença passar do ciclo silvestre para o ciclo urbano é constante. Por isso, é necessário que os fornecedores da OMS estejam sempre preparados para atender demandas maiores que ocorrem em situações de epidemia.

4.2. Mercado Nacional

O mercado nacional estava aproximadamente constante de 2012 até o final de 2016, somente com casos esporádicos da doença contraída por meio do ciclo silvestre. Com o surgimento da epidemia no final de 2016/início de 2017 começando no estado de Minas Gerais, o Brasil em estado de alerta começou a tomar medidas preventivas para que a Febre Amarela não se alastrasse. O Ministério da Saúde reforçou a distribuição em mais de 26,3 milhões de doses, distribuídas em todo o Brasil, porém com ênfase nas áreas rurais nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (MS, 2017).

Para obter uma visão geral de demanda e disponibilidade da vacina para a população nacional, foi solicitado ao Ministério da Saúde através do e-SIC (Sistema Eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão) a informação de quantidade de doses adquiridas pelo MS, com seu valor unitário, e quantidade de doses aplicadas ao longo dos 10 últimos anos. Para ter uma base dos valores unitários em dólar norte-americano, as informações de cotação média durante cada ano foram calculadas a partir de dados encontrados no site do Banco Central. Esses dados foram compilados na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de doses compradas e aplicadas pelo Ministério da Saúde em seu ano de aquisição, com seu respectivo valor unitário

Ano de aquisição	Quantidade de doses adquiridas pelo MS	Doses aplicadas	Valor unitário da dose (BRL)	Média de câmbio do dólar de Venda Comercial	Valor Unitário da dose (USD)
2004	15.000.000	4.308.851	0,49	2,925	0,17
2005	0	4.712.897	0,00	2,433	0,00
2006	8.428.350	4.257.567	0,84	2,176	0,39
2007	33.000.000	5.362.134	0,88	1,948	0,45
2008	4.000.000	17.167.454	0,90	1,837	0,49
2009	33.241.900	10.417.238	0,96	1,993	0,48
2010	46.025.000	6.712.319	1,00	1,759	0,57
2011	23.920.000	6.691.068	1,06	1,674	0,63
2012	30.000.000	5.664.667	1,06	1,954	0,54
2013	0	5.599.810	0,00	2,160	0,00
2014	9.985.790	4.387.718	1,50	2,354	0,64
2015	20.400.000	4.009.717	2,58	3,338	0,77
2016	10.125.000	5.756.810	3,03	3,483	0,87
2017	25.000.000*	6.666.680*	Não disponibilizado	3,180**	-

* Até 23/03/2017

** Até 22/08/2017

A média anual de doses adquiridas pelo Ministério da Saúde é de 18.509.003, sendo fornecidas principalmente por Bio-Manguinhos. Os anos de maior fornecimento são devido ao combate de surtos no país. Nos anos de menor compra, ou nula, pode ser considerado que a distribuição da vacina para a população foi feita a partir de um estoque de anos

anteriores. Para uma melhor visualização, os dados da tabela são mostrados em forma de gráfico na Figura 11 e na Figura 12.

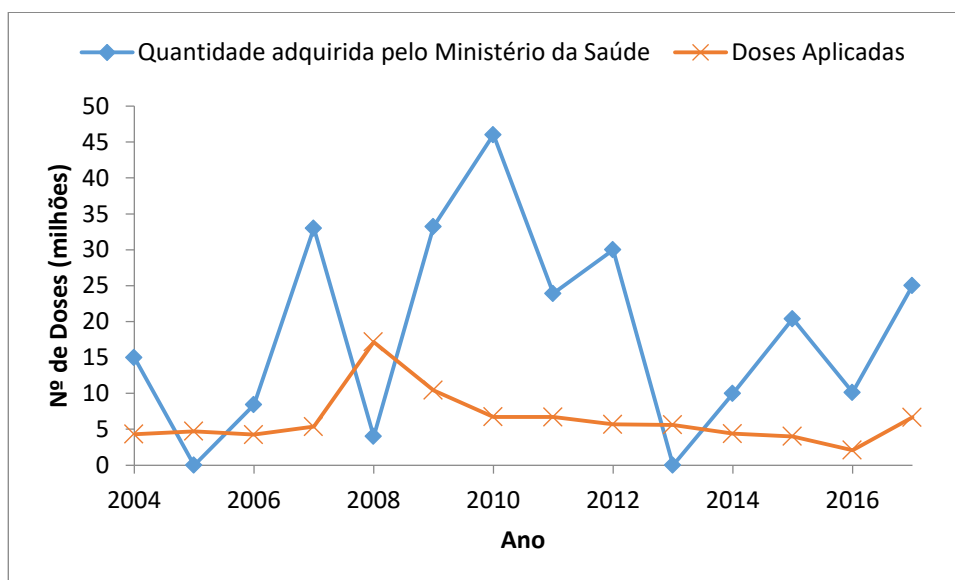


Figura 11 - Gráfico de aquisição e aplicação de doses de vacina por parte do MS de 2004 até 03/2017.

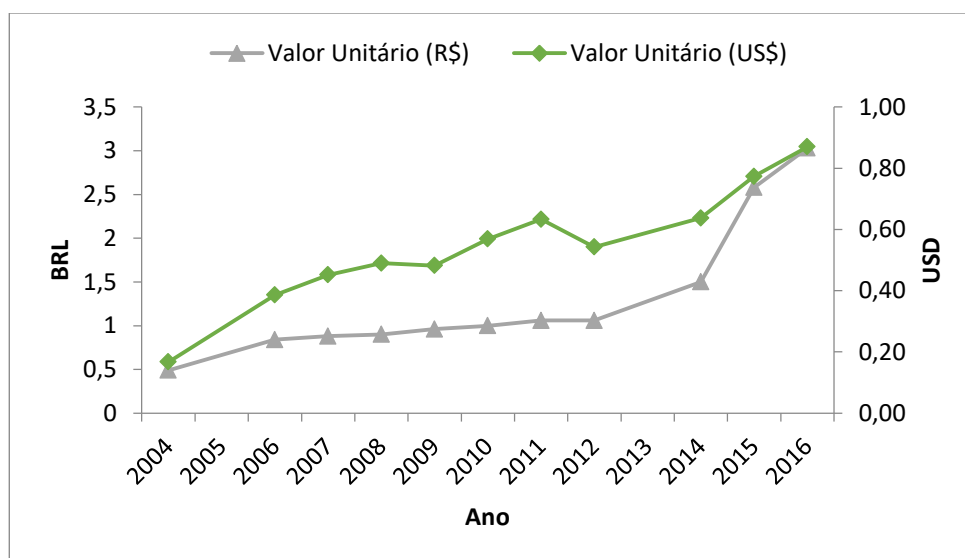


Figura 12 - Gráfico de variação de preço da dose fornecida ao MS, em Real e Dólar americano.

Ao analisar a Figura 12, é observado um aumento gradativo do preço por dose em dólar e um grande aumento quando observado em real. Possivelmente essa diferença de preço remete ao atendimento de requisitos regulatórios cada vez mais rígidos, das

crescentes exigências das Boas Práticas de Fabricação, aumento do preço de matérias-primas e inflação.

4.3. Mercado de Bio-Manguinhos

Para projeção da demanda, também foram utilizados os dados de fornecimento de Bio-Manguinhos para o mercado nacional e internacional ao longo dos anos, mostrados na Tabela 2 e na Figura 13. A média de venda total de Bio-Manguinhos desde 2005 é de 25,76 milhões de doses por ano, com sua máxima de mais de 46 milhões de doses no ano de epidemia nacional.

Tabela 2 - Fornecimento doses de vacina para febre amarela por Bio-Manguinhos

Adaptado: Pato, 2015 e Bio-Manguinhos

Ano	Mercado Interno	Mercado Externo (Exportação)	TOTAL
2005	0	23.000.000	23.000.000
2006	6.800.000	13.040.000	19.840.000
2007	9.470.000	19.110.000	28.580.000
2008	31.530.000	9.060.000	40.590.000
2009	31.640.000	14.550.000	46.190.000
2010	28.520.000	1.560.000	30.080.000
2011	23.980.000	3.690.000	27.670.000
2012	21.530.000	9.880.000	31.410.000
2013	3.810.000	8.270.000	12.080.000
2014	13.650.000	0	13.650.000
2015	19.130.000	2.310.000	21.440.000
2016*	9.550.000	5.070.000	14.620.000

* Entregue até o dia 10/10/16

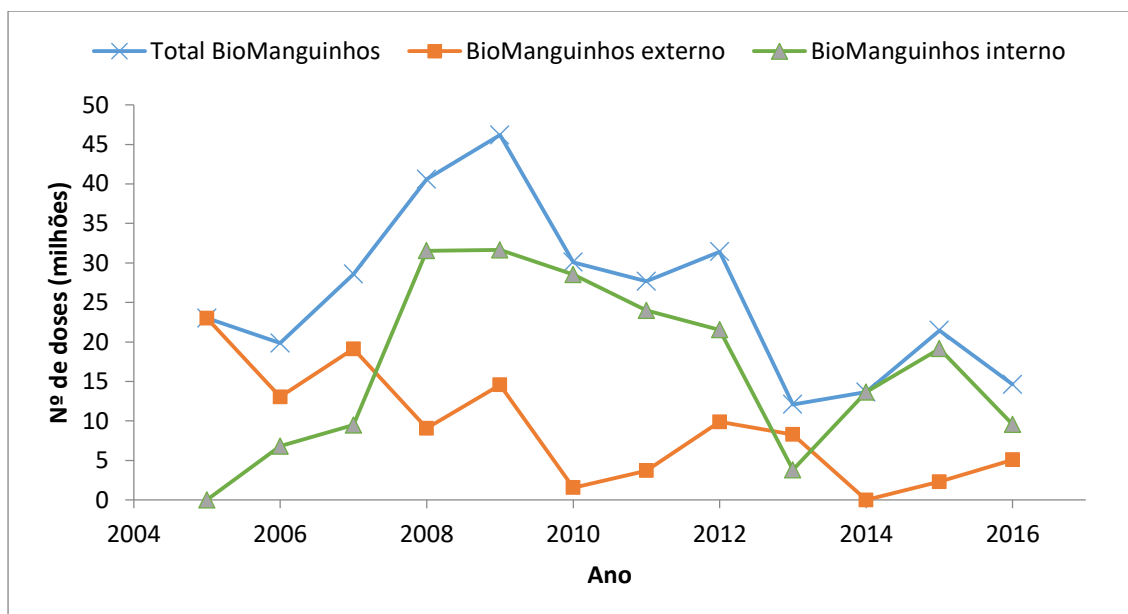


Figura 13- Gráfico de Fornecimento por ano pelo fabricante Bio-Manguinhos.

A capacidade de produção atual da vacina de febre amarela em Bio-Manguinhos é limitada em menor grau pela produção da IFA (ingrediente farmacêutico ativo) e em maior grau pelo processamento final, que engloba os processos de envase, liofilização, recravação e embalagem. Em função do processamento final, a capacidade anual de Bio-Manguinhos é em torno de 30 milhões de dose (Lopes, 2007). Em uma apresentação recente, o Diretor de Bio-Manguinhos, Artur Couto, mencionou a alta demanda nos primeiros 5 meses de 2017 devido ao surto, que fez com que toda a capacidade de processamento final fosse direcionada para aumentar a produção de vacina da FA, causando a paralisação de outras vacinas e permitindo que 35 milhões de doses de vacina de FA fossem produzidas em poucos meses.

4.4. Projeção de Demanda e Fornecimento

As vacinas são medidas preventivas, podendo ser aplicadas de 1 a até 5 vezes de acordo com seu tipo (atenuada, inativada, recombinante, etc.), com a eficácia de seus

adjuvantes e com diversos outros fatores ligados ao tipo de resposta imune desencadeada pelo antígeno.

A previsão da demanda de uma vacina geralmente é feita por meio de investigações da relação demanda/tempo considerando o comportamento futuro da demanda semelhante ao comportamento do passado e presente. Um método que pode ser aplicado com grande precisão dentre os modelos de sua classe, é o Método de Suavização Exponencial (Novaes, 2008). Esse método pode ser aplicado para estudos posteriores, porém para este trabalho a projeção foi feita de forma simplificada, com base nos dados de fornecimento de um único produtor nacional.

Para a projeção da demanda, decidiu-se adotar uma capacidade cerca de 20% superior à média anual de Bio-Manguinhos nos últimos anos, contemplando as solicitações do Ministério da Saúde e da UNICEF. Com isso, a demanda estipulada foi de 30 milhões de doses anuais de vacina de febre amarela atenuada.

A vacina de febre amarela atenuada disponível no mercado necessita de 1 dose para garantir a imunização. Já para a vacina inativada, como a que está sendo analisada, é necessário no mínimo 2 doses para garantir uma imunidade protetora (Monath *et al*, 2011), podendo precisar de uma terceira dose de reforço, como foi observado em camundongos (Pereira *et al.*, 2015). Nesse esquema de vacinação (2 doses), o número total de doses a ser produzida anualmente seria de 60 milhões.

Uma demanda maior, que contemple o número máximo de doses fornecidas em um ano, também poderia ter sido escolhida para fazer os cálculos de capacidade produtiva. Entretanto, optou-se por analisar uma demanda mais baixa que representa um cenário mais conservador.

Capítulo 5 – Processo Produtivo Industrial

O processo de produção proposto neste trabalho foi concebido a partir dos estudos realizados em conjunto por Bio-Manguinhos e COPPE/UFRJ, visando à obtenção de uma vacina inativada contra a febre amarela. Para detalhamento do processamento *upstream*, foi utilizado como referência o artigo de Mattos *et al* (2015) e para o *downstream*, a tese de Pato (2015).

Nesses estudos de referência, foram definidas condições operacionais para a escala laboratorial, sendo estes dados utilizados para a proposição do aumento de escala, especificação de equipamentos e estimativa de insumos do processo. Primeiramente, foi necessário definir algumas premissas:

- Demanda estipulada: 60.000.000 de doses, conforme discutido no capítulo anterior;
- Quantidade de antígeno por dose foi de 3,4 µg de proteína E.

Para uma imunização eficiente de uma vacina inativada para FA, foi constatado por meio de estudos clínicos de fase I que 2 doses de 4,8 µg de antígeno protegem 100% dos indivíduos e 2 doses de 0,48 µg protegem 88% (Monath *et al*, 2011). Já em estudo pré-clínico realizado em Bio-Manguinhos, foram aplicadas 3 doses em camundongos, com concentração de 2 µg de proteína E/dose que também proporcionaram 100% de proteção (Pereira *et al*, 2015). Mesmo com um dos estudos sendo feito em camundongos, o estudo em humanos mostra que um alto grau de proteção já é estabelecido com uma dosagem muito baixa de antígeno. A quantidade de antígeno foi então definida, neste trabalho, como a média dos valores que proporcionaram 100% de proteção nesses dois estudos.

- Concentração de antígeno na suspensão viral oriunda do biorreator foi de 62,75 µg de proteína E por mL (Pato, 2015);

- Fator de segurança: 20%, de modo a garantir a produção da demanda, mesmo no caso de haver perdas e ineficiências não previstas;
- Fator de perda volumétrica da suspensão viral clarificada: 15%, referente ao volume de suspensão que não se consegue recuperar por meio da decantação dos microcarregadores (Pato, informação pessoal).
- Tempo de operação da planta: 300 dias/ano;
- Tempo de batelada (Cultivo + Preparo): 7 dias;

O tempo de cultivo equivale ao tempo de crescimento da célula Vero + tempo de replicação do vírus nas células após sua infecção. O tempo de crescimento celular é de 3 dias. O tempo de produção viral também dura 3 dias (Mattos *et al*, 2015). Considerando que no dia da colheita também seja feita o preparo do tanque para uma nova batelada, o tempo total da batelada dura 7 dias. A Tabela 3 mostra um possível cronograma de atividades a ser adotado.

Tabela 3- Cronograma semanal operacional do cultivo da planta de vacina de FA

Domingo	Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira	Sábado
48 horas pós-infecção (produção do vírus): adição de meio de cultura no biorreator	72 horas pós-infecção: Colheita da SV Preparação do biorreator	Início da produção de células em biorreator	24 horas de cultivo celular: adição de meio de cultura no biorreator	48 horas de cultivo celular: adição de meio de cultura no biorreator	72 horas de cultivo celular: Infecção Viral	24 horas pós-infecção (produção do vírus): adição de meio de cultura no biorreator

O tempo necessário para o preparo do inóculo e purificação não é considerado, pois são atividades que ocorrem em paralelo ao cultivo no biorreator principal.

- Número de corridas por ano: 42 bateladas;

- Rendimento global do processo: 47,58%

Tabela 4 - Rendimento das etapas do processo produtivo

Processo <i>Downstream</i>	Rendimento
Clarificação	95,00%
Captura	80,20%
Polimento	65,73%
Inativação	95,00%
TOTAL	47,58%

- Volume de trabalho do cultivo: 235 L.

Esse valor foi estipulado por meio das premissas estabelecidas acima, fazendo os seguintes cálculos:

$$60.000.000 \frac{\text{doses}}{\text{ano}} * 3,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{dose}} * \frac{1\text{g}}{10^6\mu\text{g}} = 204 \text{ g de proteína E/ano}$$

$$\frac{204 \text{ g/ano}}{42 \text{ bateladas/ano}} * 1,2 \text{ (fator de segurança)} = 5,83 \text{ g/batelada}$$

Quantidade de antígeno a ser produzido no Biorreator

$$= \frac{5,83 \text{ g/batelada} * 1,15 \text{ (fator de decantação)}}{47,58\% \text{ (Rendimento downstream)}}$$

Quantidade de antígeno a ser produzido no Biorreator = 14,09 g/batelada

$$\text{Volume de Trabalho} = \frac{14,09 \text{ g/batelada}}{0,06275 \text{ g/L}} = 224,52\text{L}$$

Decidiu-se alterar este volume para 235 L com o objetivo de utilizar integralmente a capacidade adsorptiva da membrana de troca iônica comercial selecionada para a etapa de captura, de modo a maximizar o aproveitamento dos equipamentos comercialmente disponíveis.

A Figura 14 apresenta um diagrama de blocos contendo os equipamentos utilizados nos processos descritos nas sessões seguintes deste capítulo.

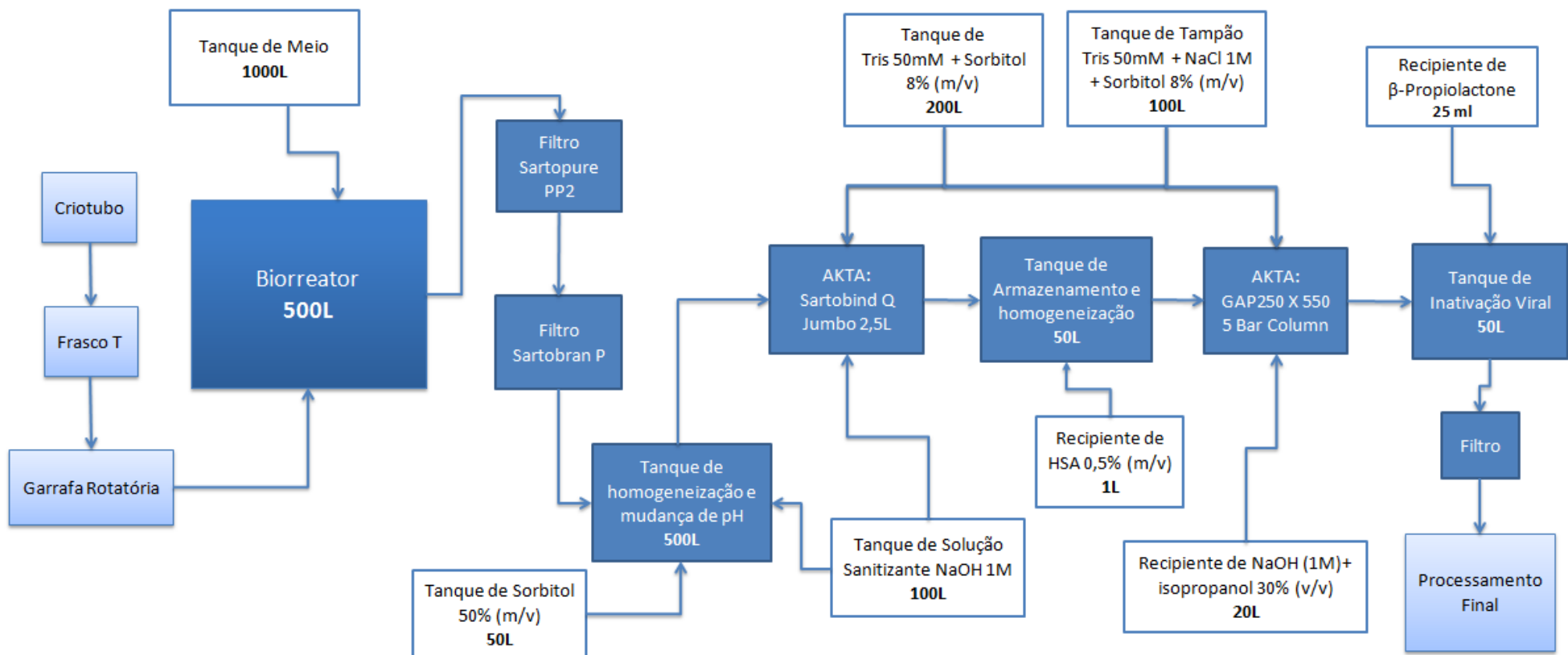


Figura 14 - Diagrama de blocos do processo produtivo proposto.

5.1. Propagação

A linhagem celular utilizada é a Vero CCL 81, adquirida do Banco Celular “*European Collection of Animal Cell Cultures*” (ECACC). A instituição produtora monta (ou contrata uma empresa especializada para fazê-lo) seu próprio Banco Celular Mãe (banco mestre), do qual é derivado um banco de trabalho com muitas alíquotas congeladas, sendo que cada lote de produção será iniciado com uma alíquota de células deste banco. O vírus, por sua vez é conservado em sistemas de lotes sementes que tem como finalidade manter o vírus vacinal o mais uniforme possível, limitando o número de passagens e consequentemente minimizando os riscos de possíveis mutações (Benchimol, 2001).

O processo em escala de bancada tem início a partir do descongelamento de um criotubo do banco de trabalho com uma concentração quantidade de 1×10^7 células. O conteúdo do criotubo é transferido para um frasco T pequeno e depois expandido para frascos T maiores, com área de 175 cm^2 . As condições de propagação são de 37°C e atmosfera com 5% de CO_2 , sendo utilizado meio livre de soro. Ao atingir a confluência, as células são tripsinizadas, rearranjam o seu citoesqueleto e se desprendem da superfície, sendo inoculadas em um biorreator contendo microesferas denominadas microcarregadores para a adesão e cultivo das células (Mattos *et al*, 2015; Pato, 2015).

Para a escala industrial, propõe-se no presente trabalho o uso de garrafas rotatórias (*roller bottles*). As garrafas *roller* tradicionais possuem área superficial de 850 cm^2 , porém existem garrafas *roller* de parede corrugada, com área de 1700 cm^2 , permitindo o uso de menos garrafas para a obtenção de uma dada quantidade de células. Foram, portanto, selecionadas garradas corrugadas, a partir das quais consegue-se obter em média 400 milhões de células por garrafa (Mattos, informação pessoal). A quantidade de *rollers* foi então calculada com base nestes dados e no volume de trabalho do biorreator, resultando na

necessidade de aquisição de um equipamento para rotação de 118 garrafas por corrida (Tabela 5).

Tabela 5 - Escalonamento da propagação de células

	Bancada (Mattos <i>et al</i> , 2015 e informação pessoal)	Industrial
Equipamento	Garrafas estacionárias (frascos T175)	Garrafas rotatórias corrugadas (<i>rollers</i>)
Área superficial	175 cm ²	1700 cm ²
Volume de Trabalho do cultivo no biorreator	2,2 L	235 L
Concentração de células para inóculo no biorreator	0,2 x 10 ⁶ células/ml	0,2 x 10 ⁶ células/ml
Quantidade de células iniciais no biorreator	4,40 x 10 ⁸	4,70 x 10 ¹⁰
Quantidade de células recuperadas/ <i>roller</i>	20 x 10 ⁶	400 x 10 ⁶
Quantidade de Equipamento	22 frascos T175	118 <i>rollers</i>

Foi também analisada a possibilidade do uso de outros equipamentos de propagação, como o Cell Factory (13 recipientes de área superficial de 25280 cm² cada) e a transferência entre biorreatores menores com o uso de microcarregadores. Porém, essas possibilidades foram descartadas devido à dificuldade da recuperação e transferência celular nos suportes das células tripsinizadas para inocular no biorreator de cultivo (Mattos, informação pessoal; Almeida, 2013).

5.2. Cultivo

Conforme explicado no início do capítulo 5, estimou-se que, para suprir a demanda calculada, o biorreator industrial deverá ter 235 L de volume útil. Em consonância com a tendência tecnológica atual na indústria biofarmacêutica, foi selecionado um biorreator do tipo tanque agitado com bolsas descartáveis (*single use*). O modelo de biorreator foi

selecionado de acordo com o menor volume comercialmente disponível que comportasse o volume de trabalho calculado: um biorreator Xcellerex de 500L (GE Healthcare).

Tabela 6 - Escalonamento do cultivo

	Bancada (Mattos <i>et al</i> , 2015 e Pato, 2015)	Industrial
Equipamento	BioFlo 110, New Brunswick	Biorreator Xcellerex, GE Healthcare
Volume de Trabalho	2,2 L	235 L
Volume do Equipamento	3 L	500 L
Concentração de microcarregador	1,5 g/L	1,5 g/L
Quantidade de microcarregador	3,3 g	352,5 g

5.2.1. Fase de crescimento celular inicial

No biorreator, as células Vero são inoculadas a uma concentração de $0,2 \times 10^6$ células/mL juntamente com 1,5 g/L de microcarregadores Cytodex 1 (GE Healthcare), dentro de um meio de cultura livre de soro de VP-SFM (Gibco, Invitrogen Corp.), 4mM Glutamax® (Gibco, Invitrogen Corp.) e 0,1% m/v de Pluronic F68 (Sigma Aldrich Co.). A adesão da célula ao microcarregador acontece em volume reduzido de 45% do volume de trabalho total, sendo metade do meio restante a ser utilizado (27,5%) adicionado após 24h os outros 27,5% após 48h. As condições de cultivo são de temperatura de 37°C, pH 7,2 e oxigênio dissolvido em 20% da saturação do ar (Mattos *et al*, 2015).

Tabela 7 - Quantidade de meio de cultivo na escala industrial

Meio	Volume / batelada
VP-SFM	227,95 L
4 mM Glutamax (adquirido na concentração de 200mM)	4,70 L
0,1% m/v Plurionic F68 (adquirido em solução de 10%)	2,35 L

5.2.3. Fase de Infecção

Para a infecção, a agitação é desligada, ocasionando a sedimentação dos microcarregadores, permitindo a retirada de 80% do meio de cultura. Um meio fresco é adicionado até 45% do volume de trabalho, realizando a infecção em volume reduzido. Isto é feito para que o vírus entre em contato mais facilmente com a célula aderida ao microcarregador, aumentando a eficácia da infecção. O vírus 17DD é então inoculado no biorreator com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,02. O restante do meio de cultura é adicionado em dois momentos, sendo 27,5% do volume final de trabalho restante adicionado em 24 h e 27,5% em 48 h, equivalente à fase de crescimento celular. A colheita é feita em três dias (72 h) após a infecção (Mattos *et al*, 2015).

Tabela 8 - Quantidade de reposição de meio de cultivo na escala industrial

Meio	Volume / batelada
VP-SFM	182,36 L
4mM Glutamax	3,76 L
0,1% m/v Plurionic F68	1,88 L

5.3. Clarificação

Ao término do período de produção viral (72 horas pós-infecção), a agitação do biorreator é desligada para que os microcarregadores, contendo as células aderidas à sua superfície, sedimentem, permitindo a recuperação da suspensão viral (sobrenadante). A perda em volume dessa etapa é de 15%, como considerado anteriormente no cálculo do volume de trabalho requerido para o biorreator.

A clarificação é feita por meio de dois filtros em série, selecionados com base em experimentos realizados em Bio-Manguinhos. O primeiro tem poros de 8µm e é feito de múltiplas camadas de polipropileno; o segundo é um filtro de 0,45 + 0,2 µm, feito de

acetato de celulose. Os filtros utilizados são descartados após cada batelada. As perdas na clarificação variam na faixa de 3-10% (Pato, informação pessoal). A recuperação média nos lotes utilizados para os cálculos foi de 95%.

Os filtros utilizados industrialmente devem possuir o mesmo tamanho dos poros que os de escala laboratorial, com suas áreas filtrantes proporcionais ao volume de trabalho, como mostrado na Tabela 9. Todas as unidades filtrantes selecionadas são da empresa Sartorius-Stedim, sendo sua cotação feita para o tamanho calculado dos filtros, mesmo estes sendo superdimensionados.

Tabela 9 - Escalonamento da clarificação

	Bancada (Pato, 2015 e informação pessoal)		Industrial	
	Sartopure PP2 MidiCaps	Sartobran P	Sartopure PP2 MaxiCaps	Sartobran P
Tamanho de poros (μm)	8,0	0,45 + 0,2	8,0	0,45 + 0,2
Volume de SV*	1,87 L	1,87 L	200 L	200 L
Área Filtrante	0,05 m ²	0,1 m ²	5,35 m ² (calculado)	10,70 m ² (calculado)
Quantidade e Tamanho do Equipamento	1 cápsula de 0,05 m ²	1 cápsula de 0,1 m ²	3 cápsulas de 1,8m ²	6 cápsulas de 1,8m ²

* volume de cultivo menos o fator de decantação (15%).

Idealmente, o processo de *downstream* deve ser feito diretamente, sem congelamento da suspensão viral clarificada. Contudo, se necessário, o congelamento pode ser realizado após a adição de um agente estabilizador. No processo estudado em escala laboratorial utiliza-se sorbitol 8% (m/v), que foi mantido para o processo em escala industrial no presente trabalho. A sua adição faz com que o volume após a filtração aumente em aproximadamente 19%, chegando a 237,80 L na escala industrial.

Essa adição de sorbitol e a mudança de pH para a entrada no próximo passo, ocorre à temperatura de 3 a 5°C, precisando ser realizado em um tanque jaquetado de mistura de 500L.

5.4. Purificação – Etapa de Captura (cromatografia de troca iônica)

A etapa de captura consiste de uma cromatografia de troca iônica em uma membrana adsortiva com grupo trocador aniônico forte Q (amônio quaternário).

Após a passagem pelos filtros, a suspensão viral (SV) clarificada tem seu pH ajustado para 8,5 com uso de NaOH 1M. Isso acontece para que a proteína E, com pI 6,38 apresente carga negativa, possibilitando a adsorção aos grupos trocadores do adsorvente de troca aniônica.

Para o aumento de escala, é necessário manter a proporcionalidade entre o volume de amostra e o volume de leito da membrana adsortiva. Nos experimentos, a Sartobind Q MA 75, com 2,1 ml de volume de leito da membrana, foi testada com 200 ml de amostra (Pato, 2015). O volume de leito calculado utilizando o volume de trabalho estipulado nos cálculos das premissas (224,52 L) foi de 2,39 L, como mostrado a seguir:

$$\text{volume de trabalho (224,52 L) * fator de decantação (1 - 15\%)} = 190,85 \text{ L}$$

$$\text{volume de suspensão viral (190,85 L) + sorbitol 8\% (36,35 L)} = 227,20 \text{ L}$$

$$\begin{array}{r} 200 \text{ ml} - - - 2,1 \text{ ml} \\ 227,20 \text{ L} - - - x = 2,39 \text{ L} \end{array}$$

A Sartobind Q Jumbo de 2,5 L é a membrana comercial com o volume de leito mais próximo ao valor calculado. Para o aproveitamento de toda área disponível nesta membrana, foi recalculado o volume de trabalho no biorreator (235 L), e feito o escalonamento desta etapa de acordo com a Tabela 10. Esse pequeno aumento de volume de trabalho não foi suficiente para diminuir o número de bateladas por ano.

Tabela 10 - Escalonamento da cromatografia de troca iônica

	Bancada (Pato, 2015)	Industrial
Membrana	Sartobind® Q MA 75	Sartobind Q Jumbo
Altura	4 mm	4mm
Volume da Membrana	2,1 ml	2,5 L
Volume de amostra aplicada	200 ml	237,80 L (após adição de sorbitol)
Volume recuperado do produto parcialmente purificado	20 ml	23,78 L
Vazão	10 ml/min	50 L/min
Tempo	35 minutos	10 minutos
Sistema	AKTA Purifier 10 (GE Healthcare)	Sistema cromatográfico customizado que atinge a vazão

As condições cromatográficas são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Soluções aplicadas em cada etapa da cromatografia de troca iônica

Etapa	Soluções	Volume Laboratório	Volume Industrial
Sanitização	NaOH 1M	50 ml	59,45 L
Equilíbrio	Tris 50mM + sorbitol 8%, pH 8,5	50 ml	59,45 L
Primeira Lavagem	Tris 50mM + sorbitol 8%, pH 8,5	30 ml	35,67 L
Segunda Lavagem	Tris 50mM + NaCl 0,15M+ sorbitol 8%, pH 8,5	50 ml	35,67 L
Eluição	Tris 50mM + NaCl 0,3M+ sorbitol 8%, pH 8,5	20 ml	23,78 L
Regeneração	Tris 50mM + NaCl 1M+ sorbitol 8%, pH 8,5	30 ml	35,67 L

Como mostrado no diagrama de blocos da Figura 14, as soluções ficam armazenadas em dois tanques, um de Tris 50mM + sorbitol 8% (m/v) e outro de Tris 50mM + NaCl 1M + sorbitol 8% (m/v). O sistema cromatográfico mistura as soluções, de modo a obter-se a concentração salina necessária para cada etapa. Esse sistema, com no mínimo duas bombas, seria utilizado na cromatografia de troca iônica e na cromatografia multimodal da etapa subsequente de purificação.

A membrana escolhida pode ser reutilizada dependendo de estudos de validação. De acordo com o fabricante, a membrana pode ser reutilizada em média de 15 a 20 vezes. No entanto, neste trabalho, foram consideradas, de forma conservadora, 5 reutilizações para não haver perda da capacidade adsortiva. Estudos de validação serão necessários para definir o número de utilizações da membrana sem perda da capacidade de adsorção. Um número maior de ciclos de uso permitiria reduzir custos.

5.5. Purificação – Etapa de Polimento (cromatografia multimodal)

Depois do processo de captura, o produto parcialmente purificado é aplicado em uma coluna empacotada com a resina multimodal CptoTM Core 700, da GE Healthcare. Essa resina é composta por um núcleo revestido por um material poroso, que exclui grandes moléculas (> 700 kDa). O núcleo tem como ligante a octilamina, que possui características hidrofóbicas e carga positiva. Este ligante retém as moléculas capazes de acessar este núcleo, ou seja, menores que o poro do material que o reveste.

Para conferir maior estabilidade à suspensão viral por meio de proteção contra tensões interfaciais e inibição de agregação, foi adicionado 0,5% (m/v) de albumina humana (HSA). Idealmente, uma albumina recombinante deve ser utilizada para que não haja nenhum componente de origem animal na vacina.

Para a ampliação de escala da cromatografia multimodal, foram mantidas a altura do leito, a velocidade linear e a proporção entre o volume de injeção (5VC) e o volume de leito de resina.

Com o cálculo do volume de resina, pode-se definir o diâmetro necessário da coluna a fim de manter a altura do leito utilizada nos experimento de bancada. Esses dados se encontram na Tabela 12. A coluna cromatográfica com o diâmetro mais próximo ao calculado foi a GAP 250 X 550 5 Bar Column, da empresa Merck.

Tabela 12 - Escalonamento da cromatografia multimodal

	Bancada (Pato, 2015)	Industrial
Coluna	HiScreen (GE Healthcare)	GAP250 X 550 5 Bar Column (Merck)
Resina	CaptoCore 700 (GE)	CaptoCore 700 (GE)
Volume de Leito	4,7 ml	4,59 L
Altura de Leito	10 cm	10 cm
Diâmetro de Coluna	0,77 cm	25 cm
Volume de HSA 0,5%	0,64 ml	0,61 L
Volume de Injeção (5VC)	25 ml	24,39 L
Velocidade linear	150 cm/h	150 cm/h
Vazão volumétrica	$1,16 \times 10^{-3}$ L/min	1,23 L/min
Tempo de processamento da amostra	22 minutos	20 minutos
Tempo total	60 minutos	48 minutos
Sistema	AKTA Purifier 10 (GE Healthcare)	Sistema cromatográfico customizado para atingir a vazão necessária.

As demais condições cromatográficas dessa etapa se encontram na Tabela 13. Como a solução de equilíbrio já é utilizada na etapa de captura, a mesma já possui um equipamento de armazenamento, fazendo com que seja necessário somente mais um tanque para estocar a solução de regeneração.

Tabela 13 - Soluções aplicadas em cada fase da cromatografia multimodal.

Etapa	Soluções	Volume Laboratório	Volume Industrial
Regeneração	NaOH 1M + isopropanol 30%	10 ml	9,76 L
Equilíbrio	Tris 50mM + NaCl 0,3M, pH 8,5 + sorbitol 8% (m/v)	25 ml	24,39 L

5.6. Inativação Viral

A inativação é feita pela adição do agente químico β -propiolactona, em uma diluição de 1:3000, dentro de um tanque de inativação. A solução é incubada por 24h sob agitação e temperatura de 4°C. O tempo de incubação poderia ser modificado já que alguns testes demonstram um tempo de 4h como suficiente. Finalizado esse período de incubação, a β -propiolactona é hidrolisada por 2 horas à 37°C, gerando o insumo farmacêutico ativo (IFA) (Pereira, 2015). Antes de seguir para o processamento final, o IFA é filtrado para diminuição da carga microbiana.

Para o dimensionamento dessa etapa foi considerado o volume de inativação de 24,43 L. O volume de β -propiolactona foi considerado, mas não é significativo. Sendo assim, foi sugerido um tanque de 50 litros, encamisado para que haja a refrigeração da solução. Para a filtração final, foi considerada a utilização de um filtro Sartobran P de 10'' de acordo com o volume final do IFA.

5.7. Processamento Final

O processamento final de uma vacina geralmente conta com as etapas sequenciais de formulação, envase, liofilização, recravação, inspeção dos frascos e embalagem. Contudo, para a vacina inativada em questão, está sendo discutida a possibilidade de ter sua apresentação na forma líquida, ou seja, sem ser liofilizada (Pato, informação pessoal). Apesar de ser um método confiável para a conservação de material biológico, a liofilização é um processo com ciclos longos e custosos, que limitam a capacidade do processamento final.

Esta etapa não foi contabilizada nos cálculos de custo de construção da planta e de aquisição de equipamentos por ser realizada em área multipropósito, especificamente construída para o processamento final de imunobiológicos e biofármacos.

5.8. Dimensionamento da Planta

O dimensionamento aproximado da planta produtiva foi feito por meio da separação dos processos por sala e das medidas de cada equipamento. As salas foram classificadas devido ao grau de limpeza do ar requerido para controle de qualidade do sistema.

Os valores encontrados (Tabela 14) foram utilizados para o estudo de viabilidade econômica realizado no próximo capítulo. O tamanho das salas e sua classificação impactam no custo de investimento inicial, com área total de 100 m².

Tabela 14 - Metragem e classificação das salas para layout da planta produtiva proposta.

Sala	Área (m ²)	Classe
Preparo de Material	5	D
Estocagem de Material	5	D
Expansão Celular	15	C
Preparo de Meio e Solução de Sorbitol	5	C
Cultivo (sistema fechado)	10	D
Preparo de Soluções	10	C
Purificação de Inativação Viral	5	C
Filtração e Preparo do IFA (sistema fechado)	5	C
Corredor	40	D

Para melhor visualização, foi montado um layout preliminar da planta proposta (Figura 15). O layout da planta teria que ser melhor discutido, podendo ser alterado de acordo com os conceitos de fluxo de material (MAL) e de pessoas (PAL), com entradas e saídas separadas para preparo e para produto.

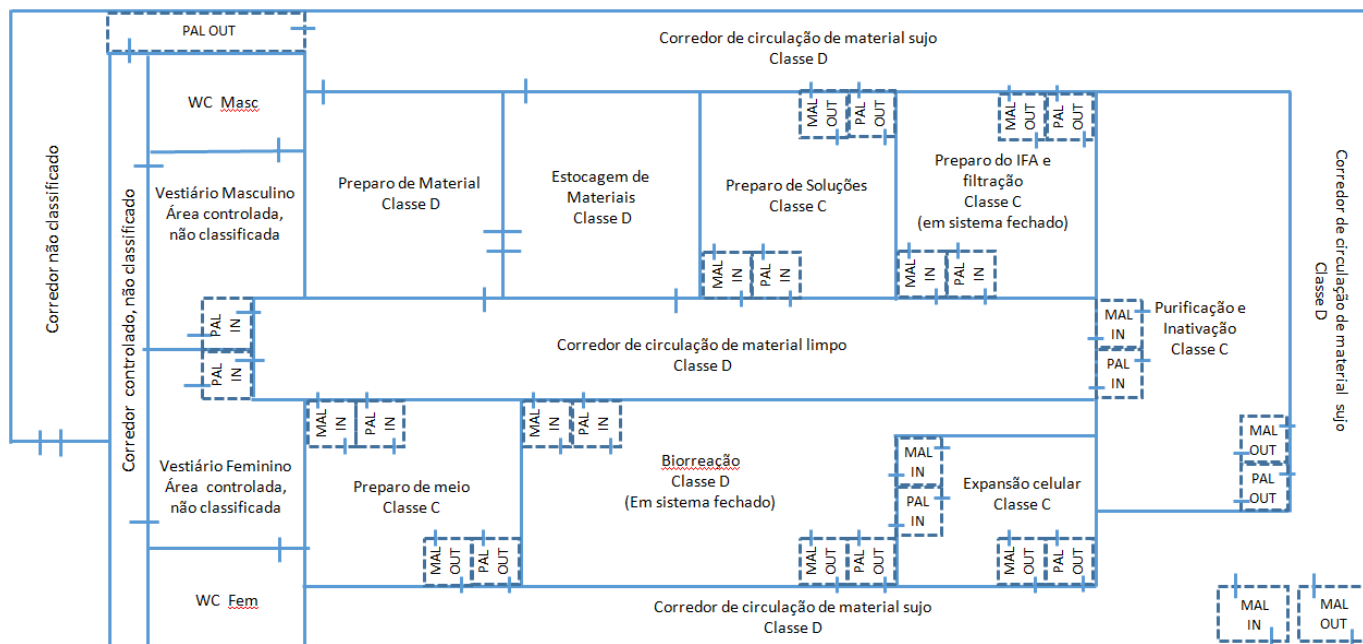


Figura 15 - Layout preliminar da planta produtiva proposta.

Adaptado: Pato, informação pessoal.

Capítulo 6 – Análise de Viabilidade

Econômica

Uma análise de viabilidade econômica é imprescindível para a avaliação de qualquer projeto, especialmente um de alto investimento, podendo ser realizada em três etapas: um Estudo de Oportunidade, um Estudo de Pré-viabilidade e finalmente um Estudo de Viabilidade Técnico-Econômica (EVTE), com uma margem de erro de 30%, 20% e 10%, respectivamente (Andrade, informação pessoal).

O estudo proposto neste trabalho tem a finalidade de mostrar a rentabilidade de um projeto, levando em consideração o mercado, o investimento de desenvolvimento da vacina, de ensaios clínicos e de assuntos regulatórios, investimento da construção da planta, custos de operação e possíveis montantes financiados. Pode ser considerado então como um Estudo de Oportunidade.

Foram calculadas as variáveis de desempenho mais utilizadas em métodos de avaliação econômica, como Valor Presente Líquido (VPL), Taxa Interna de Retorno (TIR) e Tempo de Retorno (TR) ou *Payback*, tornando possível concluir sobre a viabilidade ou não do projeto. Para obter mais conhecimento sobre o grau de viabilidade do projeto e a segurança de investir no mesmo, também foram feitas algumas análises de sensibilidade.

Como os valores monetários foram obtidos de cotações e sites nacionais e internacionais, foi preciso converter todos os valores, expressos em diferentes moedas, para USD. A taxa de câmbio utilizada foi a do Banco Central do Brasil do dia 16 de junho de 2017, mostrada na Tabela 15.

Tabela 15 - Taxas de Câmbio

Conversão	Taxa
Dólar (USD) para Real (BRL)	3,2886
Euro (EUR) para Real (BRL)	3,6803
Euro (EUR) para Dólar (USD)	1,1191

6.1. Planejamento - Horizonte Temporal

Um novo imunobiológico exige muito estudo e recursos para seu desenvolvimento, além de muito tempo para que seja comprovado como seguro e eficaz e, desta forma, ser aprovado para comercialização pela agência reguladora.

Ao elaborar um fluxo de caixa, é necessário que haja o planejamento dos gastos referentes a cada ano, seja na etapa de desenvolvimento, construção da planta ou produção do imunobiológico. Para isso, fizemos considerações de quantos anos demoraria cada fase do projeto e de seu horizonte temporal, conforme mostrado na Tabela 16. Uma das considerações feitas seria em relação à necessidade regulatória da fabricação de 3 lotes consistentes de produto, já produzidos na planta industrial, para o estudo clínico de fase III.

Após o desenvolvimento clínico, construção da planta e trâmites regulatórios para obtenção da licença de comercialização, que conjuntamente se estenderiam de 2018 a 2026, a planta iniciaria operação em 2027. Foi considerada uma vida útil de 10 anos para fins de cálculo da depreciação da planta, porém acredita-se que a mesma poderia funcionar por mais anos, visto que vacinas em geral permanecem por períodos mais longos no mercado.

Ressalta-se que o projeto está baseado em estudos concretos sobre o processamento *upstream* e *downstream*, porém carece de definições mais concretas acerca do processamento final e dos estudos pré-clínicos. Em função disto, essa etapa foi incluída no planejamento.

Tabela 16 - Horizonte temporal de etapas de desenvolvimento da vacina de FA e sua planta produtiva

Etapa	Nº de anos	Ano	Ano correspondente no Fluxo de Caixa
Testes Analíticos e Pré-Clínicos	3 anos	2018 a 2020	Ano 0, 1 e 2
Testes Clínicos: Fase I	1 ano	2021	Ano 3
Testes Clínicos: Fase II	2 anos	2022 e 2023	Ano 4 e 5
Testes Clínicos: Fase III	3 anos	2024 a 2026	Ano 6, 7 e 8
Regulatório: Registro de Produto	1 ano	2026	Ano 8
Construção da Planta	2 anos	2025 e 2026	Ano 7 e 8
Início de Produção	-	2027	Ano 9
Vida útil da planta	10 anos	2027 até 2036	Ano 9 até ano 18

6.2. Investimento de Desenvolvimento e Assuntos Regulatórios

Para avaliar os custos de etapas de desenvolvimento, testes pré-clínicos e clínicos e confecção da documentação regulatória para licenciamento do produto, foram encontradas informações de diferentes referências, como análises de empresas e conhecimento pessoal de pessoas experientes da área.

Porque a maioria das referências da área de produtos biológicos para a saúde humana consiste de medicamentos, os valores encontrados na literatura serviram como base de discussão para chegar a um valor médio de custo por voluntário envolvido em ensaios clínicos de USD 7.500,00 por indivíduo (Castilho, informação pessoal; Stewart *et al*, 2001). Como os testes clínicos referentes a vacinas envolvem em geral um conjunto de análises e um número de visitas e coletas de amostras de sangue menores do que no caso de medicamentos, o valor estipulado pode ser considerado conservador, dando, portanto, maior segurança aos resultados obtidos.

O número de indivíduos para cada fase dos testes clínicos foi estipulada por comparativo de outros testes de vacinas semelhantes:

- Fase I: 60 indivíduos, equivalentes ao estudo clínico de fase I da vacina de febre amarela produzida pela Xcerellex (GE Healthcare, 2016; Monath *et al*, 2011).

- Fase II: 2490 indivíduos, por comparação com a fase II de estudos clínicos recém iniciada em julho de 2017 para a vacina de DNA para Zika vírus (NIH, 2017).
- Fase III: 17 mil indivíduos, considerando a fase III em andamento de estudos clínicos da vacina de Dengue (Butantan, 2016).
- Fase IV: Não foi considerada no projeto por se tratar de um possível estudo posterior ao licenciamento.

Os custos dos estudos prévios (analíticos e pré-clínicos) e da parte regulatória (submissão do dossiê completo em agências regulatórias) foram estimados por médias de valores encontrados em projetos realizados anteriormente e informações pessoais.

Os dados mencionados foram compilados na Tabela 17, mostrando que o custo total de investimento destas etapas foi de mais de USD 155 milhões. Como esse custo é de grande impacto no empreendimento, foram feitas análises de sensibilidade ao final desse capítulo.

Tabela 17 - Planejamento e custo médio de estudos clínicos e regulatórios

Etapa	Nº de indivíduos	Custo por indivíduo	Custo de cada etapa (USD)
Analítico + pré-clínico	-	-	\$ 4.000.000,00
Clínico I	60	\$ 7.500,00	\$ 450.000,00
Clínico II	2490	\$ 7.500,00	\$ 18.675.000,00
Clínico III	17000	\$ 7.500,00	\$ 127.500.000,00
Regulatório: Registro do Produto	-	-	\$ 5.000.000,00
Clínico IV	-	-	-
		TOTAL	\$ 155.625.000,00

6.3. Investimento Total da Planta

O investimento total para a implantação de uma indústria consiste no somatório do investimento fixo, do capital de giro e dos custos de partida da planta (Silveira, 2005).

O investimento fixo consiste no somatório dos valores de ISBL (*Inside Battery Limits*), de OSBL (*Outside Battery Limits*) e nos custos indiretos. O ISBL engloba todos os custos relacionados ao processo produtivo, enquanto o OSBL engloba os custos de unidades auxiliares fora do processo produtivo do produto, mas ainda essenciais para seu funcionamento. Os custos indiretos não têm relação com o processo, como licenciamentos, patentes, etc. O capital de giro consiste no montante necessário para manter a planta sempre em operação. O capital de partida da planta é o custo ligado a operações para a viabilização do início da operação produtiva. O custo da validação da planta produtiva também precisa ser contabilizado, pois são feitas uma série de testes para garantir conformidade da operação da planta e do produto conforme as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

O método de cálculo do investimento fixo (Tabela 18) é baseado no custo de aquisição dos equipamentos principais da planta, conforme metodologias consolidadas na área de projeto e avaliação de processos da indústria química. Devido à necessidade de construir uma planta com áreas limpas classificadas e segregadas, cujo custo é muito elevado, foram considerados no cálculo do investimento fixo também os custos de construção das áreas limpas.

Tabela 18 - Modelo para cálculo do Investimento TotalAdaptado: Silveira, 2005; Peters e Timmerhaus, 1991; Ferreira *et al*, 1995; Douglas, 1998;

Item			Custo	
Investimento Fixo (IF)	Investimentos diretos (ID)	ISBL	Aquisição de Equipamentos (AE)	Somatório dos custos dos equipamentos principais
			Instalação dos equipamentos	45% da AE
			Controle e instrumentação	30% da AE
			Tubulações	80% da AE
			Materiais e equipamentos elétricos	20% da AE
		OSBL	45% do ISBL	
		Construção das áreas limpas - GMP	Somatório do custo por m ²	
		Investimentos indiretos	25% do ID	
		Validação	15% do AE	
		Investimento de partida	10% do IF	
Capital de giro (CG)			15% do IF	

6.3.1. Preço dos Equipamentos

Os equipamentos utilizados no processo produtivo foram cotados junto às empresas fornecedoras e os valores obtidos são apresentados na Tabela 19. Para alguns itens, mais de uma empresa fornecia o equipamento com as especificações requeridas. Nestes casos, o menor valor de mercado foi considerado.

Para preparo e estocagem de soluções e intermediários do processo foram selecionados tanques de polipropileno, com bolsas descartáveis. Para os intermediários do processo, que entram em contato com o vírus, foram selecionados equipamentos de aço inox. Para a etapa de mudança de pH + adição de sorbitol e de inativação foi considerado um tanque refrigerado em aço inox. Os equipamentos com bolsas descartáveis foram selecionados por conta da facilidade da validação do processo e de limpeza, usando menos utilidades e seguindo a tendência de mercado.

Tabela 19 - Cotação de Equipamentos

Equipamento	Empresa	Quantidade (unidade)	Preço de aquisição (USD)
Fluxo Laminar Horizontal PA 120 ECO Tamanho 4 - Classe 100	Pachane	3	\$ 20.539,14*
Estantes de Garrafas Rotatórias	Wheaton	2	\$ 30.634,02
Tanque de Meio para Cultivo - XDM SS (1000L)	GE Healthcare	1	\$ 39.700,00
Biorreator Xcellerex <i>single use</i> (500L)	GE Healthcare	1	\$ 375.397,00
Suporte para Filtro	Sartorius-Stedim	3	\$ 6.000,00
Sistema Cromatográfico customizado	GE Healthcare	1	\$ 320.000,00**
Coluna de Cromatografia Multimodal - GAP250 X 550	Merck Millipore	1	\$ 88.137,04*
Tanque de mudança de pH e adição de sorbitol (<i>Mixer</i> jaquetado+chiller de 500L)	GE Healthcare	1	\$ 129.182,00
Tanque de Sorbitol - XDM PP (50L)	GE Healthcare	1	\$ 22.600,00
Tanque de NaOH - XDM PP (100L)	GE Healthcare	1	\$ 28.200,00
Tanque de Tris 50mM + sorbitol 8% (m/v) - XDM PP (200L)	GE Healthcare	1	\$ 30.300,00
Tanque de Tris 50mM + NaCl 1M + sorbitol 8% (m/v) - XDM PP (100L)	GE Healthcare	1	\$ 28.200,00
Tanque de adição de HSA recombinante - XDM SS (50L)	GE Healthcare	1	\$ 54.329,00
ReadyKart	GE Healthcare	1	\$ 7.848,00
ReadyCircuit Tray de NaOH 1M +isopropanol 30% (20L)	GE Healthcare	1	\$ 1.127,00
Tanque de Inativação (<i>Mixer</i> jaquetado+chiller de 50L)	GE Healthcare	1	\$ 79.329,00

* Foi obtido o preço em BRL, com inclusão de taxas.

** Equipamento customizado, a partir desse preço.

6.3.2. Construção de Áreas limpas

A partir do planejamento de layout da planta produtiva com a classificação de cada sala (Tabela 14), foi possível estimar um custo para área a ser construída, descrito na Tabela 20 abaixo. O uso de tecnologias com bolsas descartáveis (*single use*) permite reduzir o requerimento de classes mais elevadas de limpeza.

Tabela 20 - Custo de áreas limpas da Planta produtiva.
Adaptado: TBioFar, 2015.

Classificação	USD/m ²	Área (m ²)	Preço (USD)
D – Classe 100000	1000	60	\$ 60.000,00
C – Classe 10000	2000	40	\$ 80.000,00
A/B – Classe 1000	3300	0	\$ -
		TOTAL	\$ 140.000,00

6.3.3. Investimento Total da Planta

A partir dos valores encontrados, foi possível inserir no modelo de cálculo do investimento total da planta produtiva para ser considerado no Fluxo de Caixa.

Tabela 21 - Custos de Investimento do Projeto

Item			Custo (USD)	
Investimento Fixo	Investimentos diretos	ISBL	Aquisição de Equipamentos	\$ 1.355.029,19
			Instalação	\$ 609.763,14
			Controle e instrumentação	\$ 406.508,76
			Tubulações	\$ 1.084.023,35
			Materiais e eq. elétricos	\$ 271.005,84
		OSBL	\$ 1.676.848,63	
		Área limpa e GMP	\$ 140.000,00	
		Investimentos indiretos	\$ 1.385.794,73	
		Validação	\$ 203.254,38	
		Investimento de partida	\$ 792.469,78	
Capital de giro			\$ 1.188.704,67	
TOTAL			\$ 9.113.402,46	

6.4. Custos de Produção

O custo total de produção (CTP) de um projeto é calculado através do somatório de seus custos fixos e custos variáveis. Os custos variáveis são aqueles que dependem da quantidade de produto produzida, sendo esses os custos de matérias-primas e utilidades. Já

os custos fixos independem da quantidade a ser produzida, sendo constantes com possíveis reajustes anuais não considerados no projeto (Peters e Timmerhaus).

Contemplados dentro dos custos fixos estão os custos de caixa diretos, os custos de caixa indiretos e o custo não-caixa. Os custos diretos são aplicados diretamente ao projeto em questão, sendo relativos à produção, incluindo mão-de-obra geral, manutenção e outras despesas. Os custos indiretos podem ser compartilhados por mais de um produto dentro de uma mesma planta produtiva, como impostos e outras despesas, sendo assim possivelmente dividido no custeio de produtos diferentes que sejam produzidos nas mesmas instalações. Os custos não-caixa são referentes ao valor de depreciação da planta, que não é considerado uma saída no fluxo de caixa, mas como a necessidade de reposição de investimento ao final da vida útil da planta.

O modelo utilizado está representado na Tabela 22. Pode ser visto que, além do modelo precisar do valor total das matérias-primas, o mesmo também requer a consideração do valor do ISBL encontrado no modelo de cálculo do investimento fixo. Para que seja possível preencher a tabela, todos os valores já existentes são colocados em função do CTP, chegando a seu valor e sucessivamente assim ao valor individual de cada variável.

$$CTP = CMP + 0,15 * CTP + MOP + 0,1 * MOP + 0,1 * MOP + 0,04 * ISBL + \\ 0,45 * MOP + 0,65 * MOP e Manutenção + 0,015 * CIF$$

Tabela 22 - Modelo para cálculo do Custo de Produção (CTP)
Adaptado: Silveira, 2005; Peters e Timmerhaus, 1991.

Item		Custo	
Custos variáveis	Matérias-primas (CMP)	Somatório dos custos de matéria-prima da produção	
	Utilidades	15% CTP	
Custos Fixos	Custos caixa diretos	Mão-de-obra (MOP)	10% CTP
		Supervisão e chefia	10% MOP
		Cargos de laboratório	10% MOP
		Manutenção	4% ISBL
		Despesas gerais	45% MOP
	Custos caixa indiretos	Despesas gerais	65% MOP e manutenção
		Impostos e seguros	1,5% IF
	Custos não-caixa	Depreciação	10% IF

6.4.1. Preço de Matérias-primas (Insumos)

Para o cálculo do somatório das matérias-primas usadas na produção do IFA, todos os insumos do processo (matérias-primas e acessórios) foram listados e cotados de acordo com as quantidades necessárias para a produção anual, referente a 42 bateladas de volume de trabalho 235L. Os insumos com seus respectivos custos são apresentados na Tabela 23. As soluções prontas não foram encontradas para cotação, sendo decidido então que estas seriam preparadas na própria planta produtiva. Embora deixe o custo de matéria-prima menor, é necessário um espaço reservado para o preparo das soluções e requer um maior uso de utilidades e mão-de-obra.

Tabela 23 - Cotação dos insumos do processo por ano.

Insumos	Empresa	Quantidade anual	Preço de aquisição (USD)
Garrafas Rotatórias de 1700 cm ²	Spectrum Chemical	4956 unidades	\$ 88.018,56
Microcarregador Cytodex 1	GE Healthcare	14805,00 g	\$ 193.368,08*
Meio VP-SFM AGT™	Gibco, Invitrogen Corp.	17233,02 L	\$ 900.795,52*
Suplemento GlutaMAX™	Gibco, Invitrogen Corp.	355,32 L	\$ 140.027,59*
Pluronic® F-68 concentrado 100X	Gibco, Invitrogen Corp.	177,66 L	\$ 55.865,17*
Bolsa de Cultivo XDR 500L PRO BBA	GE Healthcare	42 unidades	\$ 276.690,96
Bolsa básica XDM 50L	GE Healthcare	84 unidades	\$ 80.220,00
Bolsa básica XDM 100L	GE Healthcare	84 unidades	\$ 81.060,00
Bolsa básica XDM 200L	GE Healthcare	42 unidades	\$ 41.454,00
Bolsa básica XDM 500L	GE Healthcare	42 unidades	\$ 45.024,00
Bolsa básica XDM 1000L	GE Healthcare	42 unidades	\$ 60.354,00
Bolsa ReadyCircuit 20L	GE Healthcare	42 unidades	\$ 10.080,00
Filtro Sartopure PP2 (1,8m ²)	Sartorius-Stedim	126 unidades	\$ 81.900,00***
Filtro Sartobran P (1,8m ²)	Sartorius-Stedim	252 unidades	\$ 277.200,00***
Sorbitol BioUltra (HPLC)	Sigma Aldrich Co.	1657,51 kg	\$ 848.260,65*
Membrana de Cromatografia de Troca Iônica - Sartobind Q 2,5 L, 4 mm	Sartorius-Stedim	9 unidades**	\$ 136.977,84
Tris - Trizma® base	Sigma Aldrich Co.	57,95 kg	\$ 7.089,40*
NaCl BioXtra	Sigma Aldrich Co.	207,26 kg	\$ 9.066,87*
NaOH BioXtra	Sigma Aldrich Co.	123,94 kg	\$ 26.091,16*
Resina para Cromatografia Multimodal – Capto™ Core 700	GE Healthcare	192,58 L	\$ 762.422,19
Albumina recombinante	Merck Millipore	5,12 L	\$ 243.064,10*
Isopropanol	Sigma Aldrich Co.	122,92 L	\$ 15.325,20*
β-propiolactone (97%)	Alfa Aesar	392,67 g	\$ 1.886,58 *
Sartobran P (0,6 m ²)	Sartorius-Stedim	42 unidades	\$ 14.687,10*

* Foi obtido o preço em BRL, com inclusão de taxas.

** De acordo com o fabricante, a membrana pode ser reutilizada dependendo do produto e da validação do processo. Foi considerado, de forma conservadora, um valor máximo de 5 reutilizações de cada membrana para que não haja perda de capacidade adsorptiva.

*** Superdimensionado.

6.4.2. Custo Total de Produção

A Tabela 24 mostra os valores encontrados para cada componente de acordo com o modelo. Ressalta-se que a depreciação não é considerada no valor do Custo Total de Produção e que entrará como saída anual no fluxo de caixa.

Tabela 24 - Custo Total de Produção (CTP) sem considerar o processamento final

Item		Custo (USD)	
Custos variáveis	Matérias-primas	\$ 4.437.032,40	
	Utilidades	\$ 1.161.735,65	
Custos Fixos	Custos caixa diretos	Mão-de-obra	\$ 774.490,43
		Supervisão e chefia	\$ 77.449,04
		Cargos de laboratório	\$ 77.449,04
		Manutenção	\$ 149.053,21
		Despesas gerais	\$ 348.520,69
	Custos caixa indiretos	Despesas gerais	\$ 600.303,37
		Impostos e seguros	\$ 118.870,47
	Custos não-caixa	Depreciação	\$ 792.469,78
	TOTAL*		\$ 7.744.904,31

*Não considerando a depreciação

A partir do valor encontrado, foi possível calcular o custo referente à aquisição de matérias-primas por cada dose do IFA produzido (60 milhões/ano), que foi de USD 0,13 por cada dose.

Para cálculo dos custos de manufatura do produto acabado, foi acrescido o valor de USD 0,18/dose, referente ao processamento final e produção do diluente. Esse valor foi estimado a partir de dados disponibilizados por algumas indústrias farmacêuticas, porém pode estar superestimado por considerar uma produção de diluente e liofilização, que não serão necessários caso a vacina seja fornecida na forma líquida.

O Custo Total de Produção de cada dose chegaria a USD 0,31, valor que ainda não considera qualquer tipo de investimento feito; assim o preço final da vacina ainda teria que contemplar esses custos, despesas, tarifas e lucro.

Para fazer a análise correta do CTP, o custo total de cada dose precisou ser multiplicado por 60 milhões, chegando ao valor corrigido do CTP de USD 18.600.000,00. As considerações do modelo da Tabela 22 foram feitas e chegou-se a um novo valor de custo das matérias-primas incluindo o processamento final, obtendo-se assim a Tabela 25.

Tabela 25 - Custo Total de Produção (CTP) considerando o processamento final

Item		Custo (USD)	
Custos variáveis	Matérias-primas	\$ 11.167.191,73	
	Utilidades	\$ 2.790.000,00	
Custos Fixos	Custos caixa diretos	Mão-de-obra	\$ 1.860.000,00
		Supervisão e chefia	\$ 186.000,00
		Cargos de laboratório	\$ 186.000,00
		Manutenção	\$ 149.053,21
		Despesas gerais	\$ 837.000,00
	Custos caixa indiretos	Despesas gerais	\$ 1.305.884,59
		Impostos e seguros	\$ 118.870,47
	Custos não-caixa	Depreciação	\$ 792.469,78
	TOTAL*		\$ 18.600.000,00

*Não considerando a depreciação

6.5. Análise de Viabilidade Econômica

A análise de viabilidade econômica se faz necessária para avaliar a obtenção de lucro na elaboração de projetos, permitindo assim montar um estudo de retorno financeiro favorável, ao longo da vida útil da planta, para potenciais investidores.

Projetos de longo prazo envolvem receitas e despesas em instantes de tempo diferentes, por isso uma representação mais realista da parte econômica é necessária, levando em consideração o valor temporal do dinheiro. Essa representação é feita com a ferramenta de Fluxo de Caixa e sua avaliação pode ser realizada por meio do cálculo de respostas como Valor Presente Líquido (VPL), Taxa Interna de Retorno (TIR), Tempo de Retorno (*Payback*) e Ponto de Nivelamento.

Como os métodos utilizados para calcular Investimento Total e Custo Total de Produção possuem incertezas, assim como os valores apresentados nos métodos de avaliação, é sempre altamente recomendável realizar análises de sensibilidade. Estas têm como objetivo avaliar como se comportariam VPL, TIR e *payback* em caso de alterações em algumas variáveis relevantes do processo.

6.5.1. Fluxo de Caixa e Demonstração de Resultados de Exercício (DRE)

Para fazer essa avaliação de viabilidade, todo o investimento pago foi considerado como capital próprio, sem financiamento. Por isso, a única entrada no Fluxo de Caixa é da Receita Operacional da venda das vacinas. O preço adotado para a vacina foi de BRL 9,94, equivalente ao preço da vacina inativada de pólio a ser comercializada por Bio-Manguinhos (e-SIC, 2017). Como todas as avaliações foram feitas em Dólar dos EUA, o preço da dose de vacina seria aproximadamente USD 3,00. Considerando a quantidade de doses produzidas anualmente de 60 milhões, a receita operacional foi de USD 180.000.000 por ano.

As saídas do Fluxo de Caixa contam com os valores de Investimento Total, Custo Total de Produção, Despesas Operacionais e Impostos. Se tivesse um financiamento, também existiriam as saídas de Despesas Financeiras (Juros) e Amortização da Dívida. As despesas operacionais foram consideradas 24% da receita operacional (Achê, 2016). Esse parâmetro foi adotado por estar entre valores encontrados no curso de TBioFar e de outros relatórios econômicos.

A DRE simplificado é uma ferramenta que complementa o Fluxo de Caixa, fazendo ser possível analisar o valor do imposto de renda (IR) que precisa ser descontado. O imposto é somente aplicado quando o “Lucro antes do IR” for positivo e é considerado

34% desse lucro (Lima, 2016). A taxa anual de depreciação (10% IF) é contabilizada na DRE, considerado um encargo de desgaste da planta.

A quantidade de vacinas vendidas ao ano foi considerada igual à capacidade máxima de produção durante todos os anos de vida útil da planta, sendo assim todos os anos de funcionamento da planta possuem os mesmos valores na DRE (Tabela 26) e no Fluxo de Caixa (Tabela 27 e Tabela 28). Se um crescimento de produção e venda fosse considerado, os valores encontrados nos métodos a seguir seriam diferentes.

Tabela 26 – Demonstração de Resultados de Exercício (DRE)

		De cada Ano (USD Milhões)
DRE	Receita Líquida	\$ 180,00
	(-) Custos Variáveis	\$ 13,96
	(-) Custos Fixos Desembolsáveis	\$ 4,64
	Lucro Operacional Bruto	\$ 161,40
	(-) Despesas Operacionais	\$ 43,20
	Lucro Operacional EBITDA	\$ 118,20
	(-) Despesas Financeiras	
	(-) Depreciação	\$ 0,79
	Lucro antes do IR	\$ 117,41
	(-IR)	\$ 39,92
	Lucro depois do IR	\$ 77,49

Tabela 27 - Fluxo de Caixa até ano 8

Em milhões de USD		Ano 0 2018	Ano 1 2019	Ano 2 2020	Ano 3 2021	Ano 4 2022	Ano 5 2023	Ano 6 2024	Ano 7 2025	Ano 8 2026	
Entradas	Receitas Operacionais	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Financiamento	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Capital de Giro recuperado	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Valor Residual do Projeto	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Receitas Financeiras	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
Saídas	Custos de Produção	Custos Variáveis	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Custos fixos desembolsáveis	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Despesas Operacionais	Despesas de Vendas	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Despesas administrativas	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Despesas com frete	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Despesas com P&D	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Despesas Financeiras	Outras despesas	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Juros	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Investimento Total	Investimento Fixo	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 3,96	\$ 3,96
		Capital de Giro	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 1,19	\$ -
		Desenvolvimento e Regulatório	\$ 1,33	\$ 1,33	\$ 1,33	\$ 0,45	\$ 9,34	\$ 9,34	\$ 42,50	\$ 42,50	\$ 47,50
		Amortização da Dívida	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Impostos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
FLUXO DE CAIXA		\$ -1,33	\$ -1,33	\$ -1,33	\$ -0,45	\$ -9,34	\$ -9,34	\$ -42,50	\$ -47,65	\$ -51,46	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO		\$ -1,33	\$ -1,16	\$ -1,01	\$ -0,30	\$ -5,34	\$ -4,64	\$ -18,37	\$ -17,91	\$ -16,82	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO ACUMULADO		\$ -1,33	\$ -2,49	\$ -3,50	\$ -3,80	\$ -9,14	\$ -13,78	\$ -32,15	\$ -50,07	\$ -66,89	

Tabela 28 - Fluxo de Caixa de ano 9 até 18

Em milhões de USD		Ano 9 2027	Ano 10 2028	Ano 11 2029	Ano 12 2030	Ano 13 2031	Ano 14 2032	Ano 15 2033	Ano 16 2034	Ano 17 2035	Ano 18 2036	
Entradas	Receitas Operacionais	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	\$ 180,00	
	Financiamento	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Capital de Giro recuperado	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Valor Residual do Projeto	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
	Receitas Financeiras	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	
Saídas	Custos de Produção	Custos Variáveis	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96	\$ 13,96
		Custos fixos desembolsáveis	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64	\$ 4,64
	Despesas Operacionais	Despesas de Vendas										
		Despesas administrativas										
		Despesas com frete	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20	\$ 43,20
		Despesas com P&D										
	Despesas Financeiras	Outras despesas										
		Juros	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Investimento Total	Investimento Fixo	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Capital de Giro	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
		Desenvolvimento e Regulatório	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Amortização da Dívida		\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	Impostos		\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92	\$ 39,92
FLUXO DE CAIXA		\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	\$ 78,28	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO		\$ 22,25	\$ 19,35	\$ 16,83	\$ 14,63	\$ 12,72	\$ 11,06	\$ 9,62	\$ 8,37	\$ 7,27	\$ 6,33	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO ACUMULADO		\$ -44,64	\$ -25,29	\$ -8,46	\$ 6,17	\$ 18,89	\$ 29,96	\$ 39,58	\$ 47,94	\$ 55,22	\$ 61,54	

6.5.2. Valor Presente Líquido (VPL)

O VPL é uma ferramenta de cálculo financeiro que traz para o presente, ou data específica, todos os fluxos de caixa de um projeto, somando-os com o valor de investimento inicial, usando como taxa de desconto a Taxa Mínima de Atratividade (TMA). O fluxo de caixa com os valores alterados para o presente, forma o que é chamado de fluxo de caixa descontado (TBioFar, 2015; Puccini, 2011).

A TMA é uma taxa de juros que representa o mínimo que um investimento deve remunerar para que seja considerado atrativo e viável economicamente, ou seja, a taxa mínima que um investidor exige para aceitar um novo investimento (TBioFar, 2015; Puccini, 2011). Pode-se dizer, portanto, que a viabilidade do projeto depende da TMA.

Como critérios de análise, considera-se que um VPL positivo significa que as quantias futuras, descontadas à taxa mínima de atratividade, superam o investimento inicial necessário, tornando a proposta atrativa. O contrário acontece para um VPL negativo. Ao investir uma quantia igual à taxa de atratividade, o VPL se torna nulo, tornando a proposta indiferente.

Para o setor biotecnológico, pode-se encontrar na literatura TMAs de 12% (Lima, 2016) até 20% ao ano (Stewart *et al*, 2001). Para os cálculos base, foi utilizado um valor de 15% aa. Devido ao potencial da impacto da TMA nos resultados, foi feita na parte final uma análise de sensibilidade para TMA. Quando o empreendimento exige um maior risco de investimento, a TMA deve ser mais alta para contemplar esse risco. Como a vacina proposta não possui um alto risco, considera-se que a TMA estipulada para os cálculos foi realista.

O Valor Presente Líquido encontrado ao usar as condições estipuladas foi de USD 61,54 milhões. O seu valor positivo indica que o projeto é viável.

6.5.3. Taxa Interna de Retorno (TIR)

Matematicamente, a TIR é definida como a taxa de juros que faz o VPL se tornar nulo. Seu critério de análise é baseado na sua comparação com a TMA, sendo normalmente o valor limite para a taxa mínima de atratividade. Poderia ser considerada como a taxa “máxima” de atratividade ou valor limite da TMA.

Para que um projeto seja atrativo, é necessário que a TIR seja maior que a TMA. Se a TIR for menor que a TMA, quer dizer que a taxa mínima de atratividade terá ultrapassado a maior taxa que deixaria o projeto viável, ou seja, inviabilizando o investimento. Quando a TIR é equivalente à TMA, o projeto se torna indiferente. A diferença entre as taxas pode ser interpretada também como uma margem de segurança para uma melhor tomada de decisão, considerando que quanto maior essa diferença, mais seguro o investimento (Puccini, 2011).

A TIR encontrada no projeto foi de 28,41% aa. Quando comparada à TMA de 15% aa, este valor indica que o projeto estudado é também considerado viável com base nessa variável.

6.5.4. Tempo de Retorno (*Payback*)

O tempo de retorno, também chamado de *Payback*, é definido como o tempo necessário para recuperação do investimento feito. Isto é, o tempo para que o VPL seja igual à zero. Este critério é muito utilizado nas tomadas de decisão de forma prática, porém idealmente ele deve ser considerado em conjunto com a TIR e o VPL.

O *Payback* pode ser feito a partir do Fluxo de Caixa simples, descontado ou descontado acumulado. O Fluxo de Caixa simples não é muito utilizado para isso, já que não considera o valor do tempo, não contemplando projetos de longa duração. O Fluxo de caixa ideal a ser utilizado é o descontado acumulado, que soma os fluxos de caixa

descontados, permitindo ter uma análise mais geral dos custos do projeto ao longo dos anos.

Ao considerar o fluxo de caixa descontado acumulado, o tempo de retorno encontrado é de quase 12 anos. Isto significa que, após o início da comercialização, seriam necessários 4 anos para recuperação de todo o capital investido.

6.5.5. Ponto de Nivelamento

O lucro de um empreendimento é a receita total menos o custo total de produção. O Ponto de Nivelamento é exatamente o ponto onde esses valores se igualam, tornando o lucro igual à zero. O ponto de nivelamento funciona então como um indicador de quantidade mínima de produto a ser vendido pelo empreendimento para que não se tenha prejuízo. A quantidade de produto no ponto de nivelamento pode ser calculada com a seguinte fórmula:

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

A planta produtiva de vacina de febre amarela inativada proposta, tem seu ponto de nivelamento em 1.677.691 doses a serem produzidas, sendo isso 2,80% da capacidade máxima. Isto significa uma grande margem de segurança em relação ao nível de utilização da planta, de onde pode-se concluir que o projeto é viável.

Mesmo com sua quantidade mínima de produção muito baixa, os equipamentos ainda têm restrições de operação, não permitindo operar em volumes muito baixos. Além disso, diversos insumos são descartados após uma corrida, fazendo com que seja mais vantajoso produzir em menos corridas com maior capacidade operacional, o que significaria ter a planta ociosa em determinada parte do ano. Contudo, uma planta validada e ociosa pode também ser usada para a fabricação de outros produtos, aumentando ainda mais a sua viabilidade econômica.

6.6. Análise de Sensibilidade

Considerando que estudos de viabilidade sempre apresentam certo grau de incerteza, as análises de sensibilidade servem para avaliar quantitativamente o quanto uma variação em uma dada premissa adotada no estudo impactaria nos indicadores de viabilidade econômica, como TIR e VPL. Os parâmetros que proporcionalmente provocam maior variação no VPL são classificados como sensíveis.

Os seguintes parâmetros foram considerados críticos e foram, portanto, objeto de análise de sensibilidade: preço de cada dose, TMA e custo de estudos clínicos.

6.6.1. Sensibilidade em relação ao preço por dose

O estudo de sensibilidade do preço unitário da vacina é necessário pelo projeto ser de alto custo com o uso de nova tecnologia, precisando ser comparado com o valor da vacina fabricada atualmente. O método de fabricação atual da vacina, feito com ovos de galinha, é muito rudimentar quando comparado ao método proposto, fazendo com que o preço da vacina inativada feita com células Vero tenha um valor diferenciado.

Os resultados para TIR e VPL em função de variações no preço da dose podem ser vistos na Tabela 29 e na Figura 16. A faixa escolhida (USD 1,00 a USD 5,00 por dose) se deu pelo fato da vacina atenuada atualmente disponível ter um custo unitário de aproximadamente USD 1,10, então foi estudada uma variação nesta amplitude para mais e para menos.

Tabela 29 - Sensibilidade do preço por cada dose

Preço da Dose (USD)	Variação (%)	VPL (USD Milhões)	TIR (%)
1,00	-66,67	\$ -37,21	1,38
2,00	-33,33	\$ 12,17	18,21
3,00	0,00	\$ 61,54	28,41
4,00	33,33	\$ 110,92	35,94
5,00	66,67	\$ 160,30	41,94

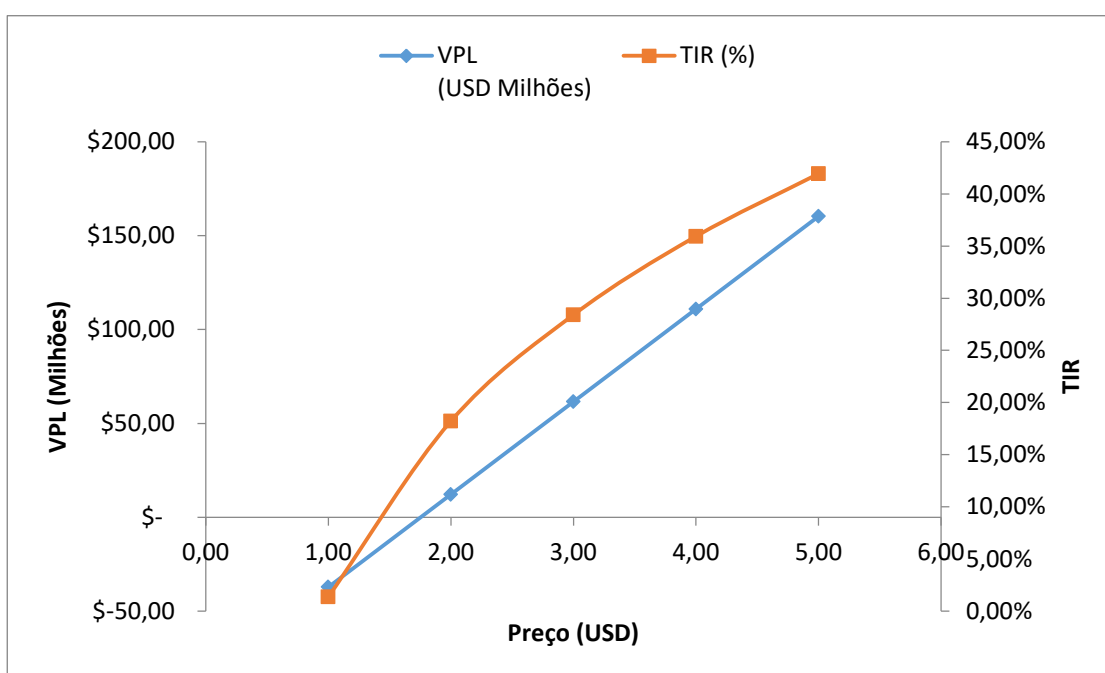


Figura 16 - Gráfico de sensibilidade do preço unitário.

Observa-se na Figura 16 que, ao atingir o preço de USD 1,75 por dose, o projeto apresenta um VPL nulo, tornando-se um projeto inviável. Considerando a grande diferença entre as tecnologias comparadas, o preço do ponto de transição pode ser considerado baixo.

6.6.2. Sensibilidade em relação à TMA

A análise de sensibilidade da TMA se mostrou importante pelo fato do VPL ser muito sensível a essa taxa, sendo a demonstração de sua variação de extrema importância para um investidor e da taxa não estar bem definida na literatura para um projeto biotecnológico referente a vacinas.

Foi analisada então uma faixa relativamente ampla (10 a 20% aa) de TMA, cobrindo a gama de valores encontrados na literatura para projetos na área biotecnológica.

Conforme mostrado na Tabela 30 e na Figura 17, pode ser vista a variação do VPL conforme a TMA, que será nulo quando a TMA for igual à TIR, 28,41%.

Tabela 30 - Sensibilidade à TMA

TMA (%)	Variação (%)	VPL (USD Milhões)	TIR (%)
10,00	-33,33	\$ 135,78	28,41
12,00	-20,00	\$ 99,63	28,41
14,00	-6,67	\$ 72,49	28,41
15,00	0,00	\$ 61,54	28,41
16,00	+6,67	\$ 52,04	28,41
18,00	+20,00	\$ 36,61	28,41
20,00	+33,33	\$ 24,94	28,41

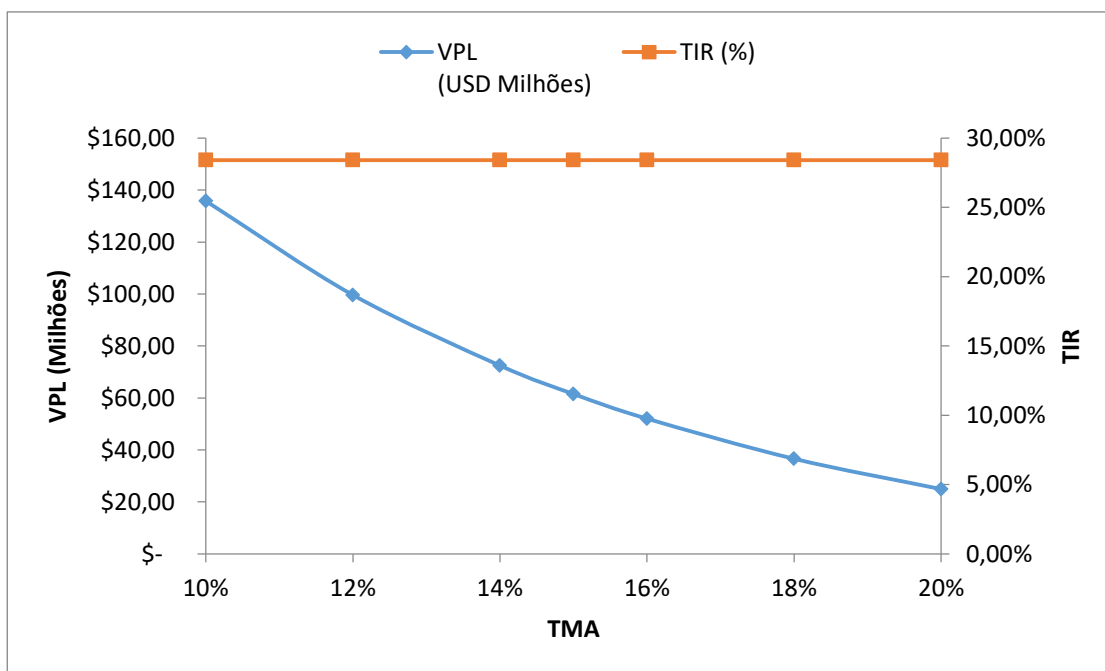


Figura 17 - Gráfico de Sensibilidade à TMA.

6.6.3. Sensibilidade em relação ao custo dos Estudos Clínicos

A realização dos estudos clínicos é essencial para comprovação da segurança e eficácia de um produto para a saúde humana, portanto indispensável para obter junto às agências regulatórias a licença para comercialização de um produto. Trata-se de uma etapa

que representa um componente de alto custo do investimento inicial total e que tem que ser realizado antes de qualquer faturamento.

Diversas referências sobre possíveis custos dos estudos clínicos foram encontradas, além de diferentes quantidades de pacientes e seus custos unitários. Para possibilitar uma avaliação geral de como esse valor interferiria na viabilidade do projeto, decidiu-se incluir esse parâmetro no estudo de sensibilidade. Os dados da Tabela 31 e Figura 18 confirmam o resultado de viabilidade quando se simula uma variação de 30% para menos e para mais no valor total dos testes clínicos (fases I, II e III).

Tabela 31 - Sensibilidade dos Custos de Estudos Clínicos

Custos de Estudos Clínicos (USD)	Variação (%)	VPL (USD Milhões)	TIR (%)
102.637.500,00	-30	\$ 79,10	34,96
117.300.000,00	-20	\$ 73,25	32,56
131.962.500,00	-10	\$ 67,40	30,38
146.625.000,00	0	\$ 61,54	28,41
161.287.500,00	+10	\$ 55,69	26,60
175.950.000,00	+20	\$ 49,84	24,95
190.612.500,00	+30	\$ 43,99	23,43

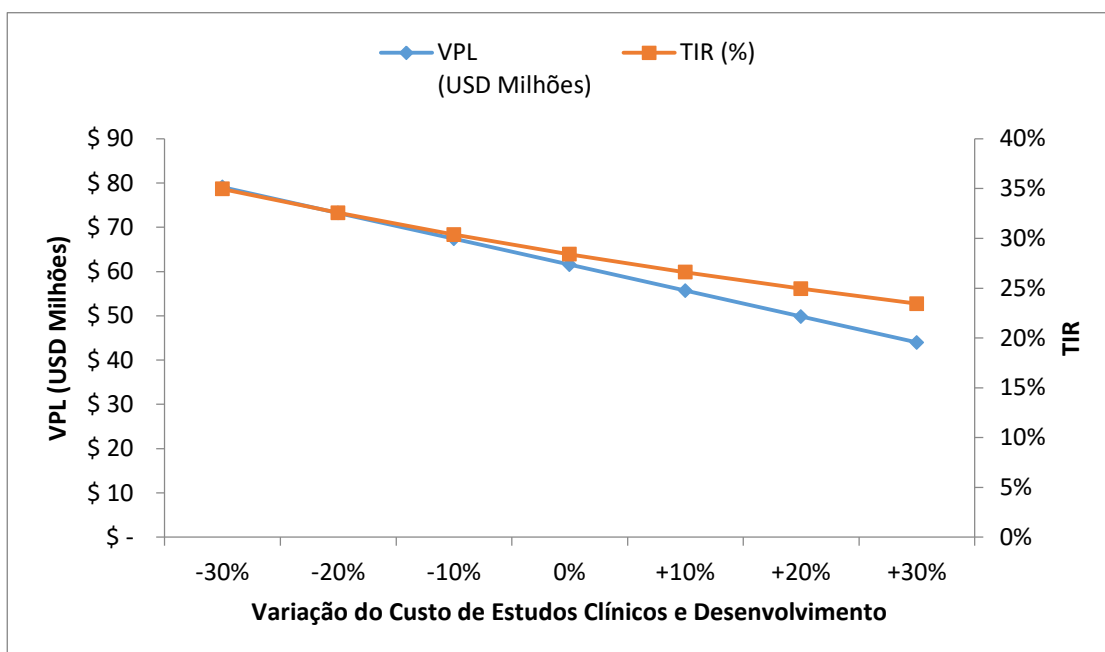


Figura 18 - Gráfico de Sensibilidade aos custos de ensaios clínicos

6.6.4. Sensibilidade em relação ao número de voluntários na fase III de estudos clínicos

Ao observar o resultado da análise de sensibilidade anterior, pode-se pensar que o custo de estudos clínicos não oferece um alto risco para a viabilidade do projeto, mas essa análise não estuda a fundo qual seria a mudança mais drástica do preço dos testes clínicos. O número de voluntários a serem vacinados na fase III dos estudos é muito elevado e varia muito de vacina para vacina, portanto analisar este fator especificamente é relevante.

A faixa de número de voluntários foi escolhida com base em dados da literatura e informações coletadas junto a profissionais da indústria de vacinas, tendo-se analisado de 4 mil (Firbas e Gilma, 2015) a 30 mil indivíduos (Castilho, informação fornecida com base em dados coletados junto a membros da indústria). Pode ser visto na Tabela 32 e na Figura 19 que, mesmo com grandes variações no número de indivíduos participantes da fase III dos testes clínicos, o projeto se mantém viável.

Tabela 32 - Sensibilidade do nº de voluntários da fase III de estudos clínicos

Nº de voluntários	Variação (%)	VPL (USD Milhões)	TIR (%)
4.000	-76	\$ 98,44	42,51
10.000	-41	\$ 81,41	35,28
14.000	-18	\$ 70,06	31,15
17.000	0	\$ 61,54	28,41
20.000	18	\$ 53,03	25,94
24.000	41	\$ 41,68	23,02
30.000	76	\$ 24,65	19,30

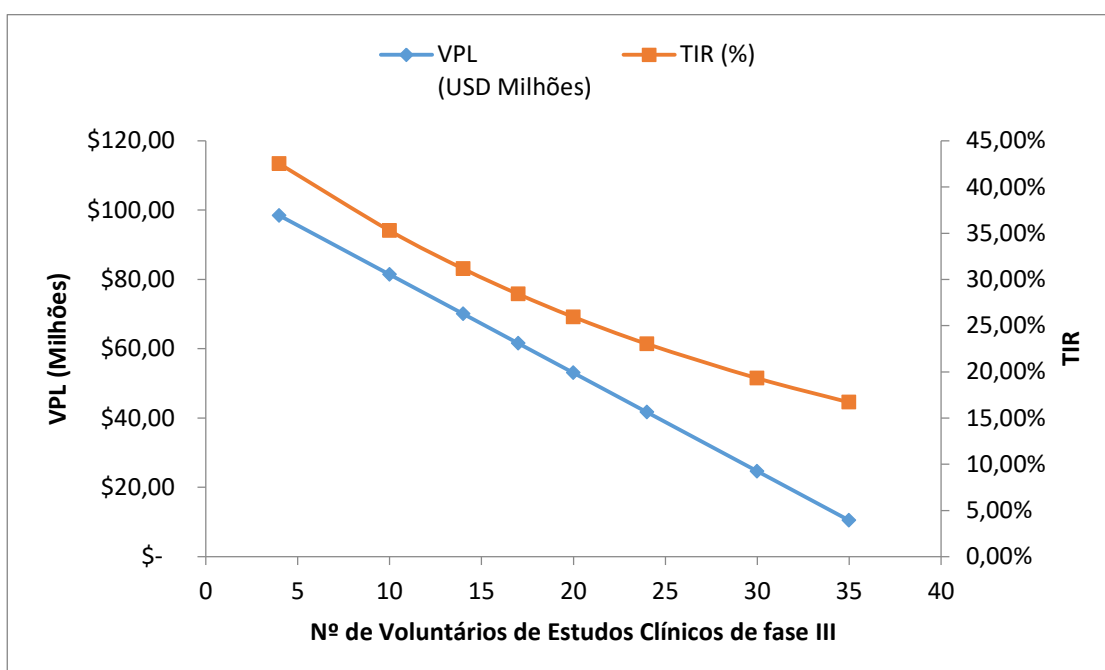


Figura 19 - Gráfico de Sensibilidade da variação do nº de voluntários da fase III de estudos clínicos.

Capítulo 7 – Conclusões e sugestões

A vacina de febre amarela atenuada, produzida a partir de ovos embrionados de galinha, é comercializada mundialmente, trazendo a imunização dessa doença a diversos países endêmicos. Apesar de ser considerada bastante segura e eficaz, a vacina atenuada pode apresentar efeitos adversos graves, incluindo a morte, em determinados grupos de indivíduos (imunodeprimidos, bebês até 9 meses e idosos). Além disso, a utilização de ovos para replicação do vírus impossibilita a vacinação de indivíduos com alergia a proteínas do ovo e dificulta a resposta a epidemias devido às limitações para rápida ampliação da produção requerida em situações emergenciais. Por estas razões, o desenvolvimento de uma vacina inativada vem sendo discutida na literatura mundial há vários anos (Hayes, 2010). Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e a COPPE/UFRJ vêm desenvolvendo um projeto com este objetivo desde 2003.

Uma análise de mercado foi realizada e levou à definição de uma demanda anual de 60 milhões de doses para a vacina inativada, levando em consideração o fornecimento anual de vacina de febre amarela atenuada de Bio-Manguinhos ao mercado interno e externo nos últimos anos e um esquema de vacinação de duas doses para a vacina inativada.

O dimensionamento dos equipamentos requeridos para operar o processo em escala industrial foi feito com base na demanda encontrada e em dados obtidos em escala de bancada no âmbito do projeto de pesquisa Bio-Manguinhos/UFRJ.

Para a realização da análise econômica, foi feita a cotação dos equipamentos e das matérias-primas e dos acessórios do processo produtivo. Para possibilitar a montagem do fluxo de caixa, foram estimados, ainda, os custos de testes clínicos, assuntos regulatórios e construção da planta, esta tendo como base um desenho preliminar de planta proposto neste trabalho. Os indicadores de viabilidade econômica estudados (valor presente líquido –

VPL, taxa interna de retorno – TIR, e tempo de retorno ou Payback) mostraram que o projeto proposto é economicamente viável.

Análises de sensibilidade foram realizadas para avaliar o impacto de uma variação nos custos associados a variáveis críticas, como preço de venda do produto, taxa mínima de atratividade (TMA) e custos de estudos clínicos. Os resultados mostraram que a viabilidade do empreendimento é robusta, tornando-se inviável do ponto de vista econômico apenas no caso de uma brusca queda do preço por dose de vacina, para menos da metade do valor considerado como caso base, que foi de USD 3,00 por dose, equivalente ao valor da vacina inativada de poliomielite fornecida por Biomanguinhos/FIOCRUZ ao governo brasileiro em 2017.

A questão do preço de venda é de grande importância, porque os países com maior incidência de casos de febre amarela são países da África. Por causa do índice de pobreza na região, a compra de VFA inativada só seria possível através do apoio de instituições como a Fundação Bill & Melinda Gates, que se comprometeu a custear vacinas para países em necessidade (BMGF, 2017).

Como a planta projetada tem a maioria de seus equipamentos baseados em tecnologia *single use*, há a flexibilidade de operá-la em campanhas, compartilhando-a com outros imunobiológicos. O uso da planta para a manufatura de outros produtos poderia diminuir os custos e tornar o projeto ainda mais viável.

7.1. Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar mais estudos (pré-clínicos e/ou clínicos) para confirmar se o esquema de vacinação de 2 doses de 3,4 µg cada é o ideal para a vacina. O fato de a planta ter sido projetada com base majoritariamente em tecnologia *single use* a torna flexível para

acomodar mudanças de demanda, para cima e para baixo, sem grandes impactos sobre a viabilidade econômica, como foi mostrado na análise do ponto de nivelamento.

- Realizar os cálculos de viabilidade da planta, considerando o financiamento do montante do investimento.
- Realizar estudos de demanda, escalonamento e viabilidade econômica para um cenário em que a vacina inativada seria a primeira dose, e a vacina atenuada seria usada para segunda dose, combinando assim segurança e longa proteção e podendo vacinar quase todas as subpopulações.
- Considerar, para este último cenário, duas alternativas: manter a produção da vacina atenuada em ovos, ou dimensionar a planta baseada em células Vero para produzir tanto os lotes de vacina atenuada quanto de inativada. Se a vacina atenuada passar a ser produzida em Vero e ser de alta pureza, não haverá mais restrição para indivíduos com alergia.
- Fazer uma nova análise considerando o aumento gradativo da venda ao longo dos anos. O estudo de viabilidade feito neste projeto considerou que a planta estava operando, desde seu primeiro ano, em sua capacidade máxima e com venda de 100% da demanda estabelecida. Um aumento progressivo das vendas provocaria alterações na receita e nos custos de matérias-primas e acessórios do processo, modificando o perfil de viabilidade econômica da planta.
- Fazer uma nova análise de sensibilidade, avaliando a variação de dois parâmetros simultaneamente.
- Estudar alternativas para reduzir ainda mais o custo de produção da vacina inativada, para atingir as metas estabelecidas, por exemplo, pela Fundação Bill & Melinda Gates

(BMGF), a qual está desafiando a comunidade científica e industrial na área de vacinas a alcançar um preço final de vacinas em geral de USD 0,10 por dose, começando com a vacina de Pólio. (Castilho, informação obtida no Workshop MIT-UCL de vacinas, junho de 2017).

Referências Bibliográficas

Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. e Controladas, Demonstrações Financeiras, 2016. Disponível em: <http://www.ache.com.br/arquivos/demonstracoes/DF-Ache-2016_final-docx.pdf>, acessado em 03 de julho de 2017.

Almeida AG, Desenvolvimento de protocolo passível de ampliação de escala para a propagação de células vero em microcarreadores. 2013. 105. Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos / FIOCRUZ.

Benchimol, J, *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada*. Editora FIOCRUZ, 1 de janeiro de 2001 - 470 páginas.

Bill & Melinda Gates Foundation (BMGF). Disponível em <<https://www.gatesfoundation.org/What-We-Do/Global-Development/Vaccine-Delivery>>, acessado em 15 de agosto de 2017.

Butantan Institute, Phase III Trial to Evaluate Efficacy and Safety of a Tetravalent Dengue Vaccine, Identifier: NCT02406729, 2016. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02406729?term=phase+III&cond=Dengue&draw=2&rank=1>> acessado em 28 de junho de 2017.

Carvalho R, *Controle Estatístico Do Processo De Produção Da Suspensão Viral Da Vacina Contra Febre Amarela Fabricada Por Bio-Manguinhos/Fiocruz*. 100 folhas. Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz, Instituto De Tecnologia Em Imunobiológico. 2005.

CDC, Yellow Fever Maps. Disponível em <<https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/index.html>>, acessado em 02 de agosto de 2017.

Pato TP, *Desenvolvimento de um processo de purificação do vírus da Febre Amarela produzido em células VERO*. 2015. 114 folhas. Tese de Doutorado em Ciências – Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Douglas JM, *Conceptual Design of Chemical Processes*. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 1ª ed, Nova York, 1998.

Ferreira JSG, Castilho LR, Paiva SP, *Produção de Pectinases para a Indústria de Bebidas*, 1995. Projeto Final de Curso, Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro.

Firbas C, Gilma B, *Product review on the JE vaccine IXIARO*, Human Vaccines & Immunotherapeutics v.11, ed.2, p.411- 420, 2015.

Gardner CL, Ryman KD, *Yellow Fever: A Reemerging Threat*. Clinics in Laboratory Medicine, v.30, n. 1, p. 237-260, 2010.

GE Healthcare, Clinical Trial.Gov, Trial of Yellow Fever Inactivated Vaccine, Identifier: NCT00995865, 2016. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00995865?recrs=e&cond=Yellow+Fever&draw=1&rank=3>> acessado em 28 de junho de 2017.

Hayes EB, *Is it time for a new yellow fever vaccine?*, *Vaccine*, v.28, p.8073–8076, 2010.

Huang YS, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL, *Flavivirus-Mosquito Interactions*, *Viruses*, v. 6, 11^a edição, p. 4703-4730, 2014.

Lima TM, Avaliação Técnico-Econômica Da Produção De Um Anticorpo Monoclonal Biossimilar Ao Evolocumabe No Brasil, 2016. Projeto Final de Curso, Escola de Química/UFRJ.

Lopes RC, Projeto de Aumento da Capacidade de Produção da Vacina Contra a Febre Amarela, 2007. Dissertação de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos no Instituto Oswaldo Cruz.

Mattos D, Silva MV, Gaspar LP, Castilho LR, *Increasing Vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred-tank bioreactors using serum-free medium*, *Vaccine*, v.33, ed.35, p.4288-4291, 2015.

Ministério da Saúde, Guia de Vigilância Epidemiológica, 7a edição. Brasília, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf>, acessado em 08 novembro de 2015.

Ministério da Saúde (MSa), Guia De Vigilância Em Saúde, Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/27/guia-vigilancia-saude-linkado-27-11-14.pdf>>, acessado em 19 de maio de 2016.

Ministério da Saúde (MSb), Secretaria de Vigilância em Saúde, NOTA INFORMATIVA Nº143/CGPNI/DEVIT/SVS/MS, Brasília, Dezembro de 2014. Disponível em: <<http://sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2015/02/Nota-Informativa-143-2014-Febre-Amarela.pdf>>, acessado em 18 de agosto de 2015.

Ministério da Saúde, COES – Febre Amarela, Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela, Informe – Nº 43/2017.

Monath TP et al, *Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity*, *Vaccine*, v.28, p. 3827–3840, 2010.

Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Balser J, Morin MJ, Sisti M, Trent DW, *An Inactivated Cell-Culture Vaccine Against Yellow Fever*, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 364, nº14, p. 1326-1333, 2011.

Monath TP, Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses, *Vaccine*, v.11, nº 4, p.427-448, 2012.

Monath TP et al. Licensed vaccines: Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin, S.A.; Orenstein, W.A.; Offit, P.A. (Orgs.). *Vaccines*, 6a edição, Elsevier Inc., 2013, p. 870-968.

Monath TP, Vasconcelos PFC, *Yellow Fever*, Journal of Clinical Virology, v. 64, p. 160-173, 2015.

NIH, Phase 2 Zika vaccine trial begins in U.S., Central and South America, 2017.
<<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/phase-2-zika-vaccine-trial-begins-us-central-south-america>> acessado em 28 de junho de 2017.

Novaes MLO, Gonçalves AA, Simonetti VMM. *Impactos da Utilização de um Modelo de Previsão de Demandas no Setor de Imunizações*. Em: XXXII Encontro ANPAD, setembro de 2008, Rio de Janeiro.

PAHO, Epidemiological Alert - Yellow Fever, 22 de abril de 2016. Disponível em <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34248&lang=en>, acessado em 8 de junho de 2016.

Pereira RC et al, *An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures*, Vaccine, v.33, ed.35, p.4261-4268, 2015.

Peters MS e Timmerhaus KD, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, ed.4, 1991.

Plotkin SA et al. *Vaccines*, ed.5, Philadelphia: Saunders, 2008.

Portal da Saúde, 2017a. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28003-febre-amarela-brasil-adota-dose-unica-da-vacina-por-recomendacao-da-oms>>, acessado em 15 de agosto, 2017.

Portal da Saúde, 2017b. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-febre-amarela>>, acessado em 31 de julho, 2017.

Puccini EC, *Matemática Financeira e Análise de Investimentos*, Ministério da Educação – MEC. Florianópolis: Departamento de Ciências da Administração/UFSC; Brasília: CAPES: UAB, 2011.

Resolução - RDC Nº 55, de 16 de Dezembro de 2010 - Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde,

SBPPC, 2017. “*Quais as fases de um estudo clínico?*”
<http://www.sbppc.org.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=37>, acessado em 28 de junho de 2017.

Sebrae Nacional, 11/01/2016. Disponível em:
<<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/pesquisa-de-mercado-o-que-e-e-para-que-serve,97589f857d545410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>, acessado em 18 de julho de 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela, 2004. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf>, acessado em 08 de novembro de 2015.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>>, acessado em 20 de agosto de 2017.

Silveira CR, Petrocínio FRM e Braga JS, *Projeto de uma Planta para a Produção de Fator VIII recombinante*, 2005. Projeto Final de Curso, Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro.

Souza MCO, *Produção Do Vírus Da Febre Amarela Em Células Vero Utilizando Biorreatores Agitados*. 2007. 134 folhas. Tese de Doutorado em Ciências – COPPE/UFRJ.

Stewart JJ, Allison PN, Johnson RS, *Putting a price on biotechnology*, Nature Biotechnology, 19, p.813-817, 2001.

TBioFar, Projetos e empreendedorismo no setor biofarmacêutico. Programa de Treinamento em Biotecnologia Farmacêutica UFRJ/COPPE/EQ. Rio de Janeiro, 2015.

UNICEF, *Yellow Fever Vaccine: Current Supply Outlook*, UNICEF Supply Division, Maio de 2016. Disponível em <http://www.unicef.org/supply/files/YF_number_3_Supply_Update.pdf>, acessado em 22 de junho, 2016.

UNICEF, *Yellow Fever Vaccine: Current Supply Outlook*, UNICEF Supply Division, Novembro de 2013. Disponível em <http://www.unicef.org/supply/files/YF_number_3_Supply_Update.pdf>, acessado em 13 de outubro, 2015.

UNICEF, *Yellow Fever Vaccine: Current Supply Outlook*, UNICEF Supply Division, Março de 2015. Disponível em <http://www.unicef.org/supply/files/YF_number_3_Supply_Update.pdf>, acessado em 14 de janeiro, 2016.

UNICEF (b), 2016. Disponível em <https://www.unicef.org/supply/index_91900.html>, acessado 16 de agosto de 2017.

UNICEF, 2017. Disponível em <https://www.unicef.org/supply/index_91900.html>, acessado 16 de agosto de 2017.

World Health Organization (WHOa), Yellow Fever Fact Sheet, Maio 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>, acessado em 18 de maio de 2016.

World Health Organization (WHOb), Weekly epidemiological record, No. 27, 2013, ano 88, p. 269–284. Disponível em <<http://www.who.int/wer/2013/wer8827.pdf>>, acessado em 20 de janeiro de 2016.

World Health Organization (WHOc), Yellow fever: a current threat. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/impact/en/>>, acessado em 08 de maio de 2016.

World Health Organization (WHOd), Yellow fever: Questions and answers. Disponível em <<http://www.who.int/features/qa/yellow-fever/en/>>, acessado 19 de maio de 2016.

World Health Organization (WHO), Weekly epidemiological record, No. 14, 2016, ano 91, p. 181–192. Disponível em < <http://www.who.int/wer/2016/wer9114.pdf>>, acessado em 14 de junho de 2016.

World Health Organization (WHO), Weekly epidemiological record: Yellow fever in Africa and the Americas, 2016. Publicado em Genebra dia 11 de agosto, 2017. Disponível em <<http://www.who.int/iris/handle/10665/258709>>, acessado em 14 de agosto de 2017.

World Health Organization (WHO), *Annex 1: Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations*. Technical Report Series n° 924, 2004