

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Maira Galdino da Rocha Pitta
César Augusto Souza de Andrade

**Coordenadores do Programa
UNINOVARTIS-UFPE**

Copyright@by **Organizadores**

Todos os direitos reservados aos Organizadores

Maira Galdino da Rocha Pitta
César Augusto Souza de Andrade
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Breno Caldas de Araújo
Kamila de Melo Vilar
Flaviana Alves dos Santos
Anderson Rodrigues de Almeida
Wagner Luis Mendes de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha Catalográfica

158 Inovação tecnológica em fármacos e medicamentos. / Maira Galdino da Rocha Pitta, [et al.]. (Organizadores). – Olinda: Livro Rápido, 2017.

524 p.

Contém bibliografia ao final de cada capítulo

ISBN 978-85-5707-492-7

1. Inovação tecnológica - Fármacos. 2. Fármacos e Medicamentos. 3. Métodos imunoquímicos. 4. Indústria farmacêutica. I. Pitta, Maira Galdino da Rocha. II. Título

Fabiana Belo - CRB-4/1463

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Organizadores

Maira Galdino da Rocha Pitta

César Augusto Souza de Andrade

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Breno Caldas de Araújo

Kamila de Melo Vilar

Flaviana Alves dos Santos

Anderson Rodrigues de Almeida

Wagner Luis Mendes de Oliveira

Autores

Adalúcia da Silva	Ellison Neves de Lima
Amanda Florencio Silva	Filipe Colaço Mariz
Ana Claudia Carvalho	Flaviana Alves dos Santos
Anderson Rodrigues de Almeida	Gabriela Souto Vieira de Mello
Antonio Carlos de Freitas	Gustavo Barbosa de Lima
Antônio Felix da Silva Filho	Ingrid Tavares de Lima
Bárbara Kerolen Silva	José Lamartine Soares Sobrinho
Breno Caldas de Araújo	Kamila de Melo Vilar
Bruno Severo Gomes	Maira Galdino da Rocha Pitta
Camila Ficker Sabino Santos	Maria Andreza Bezerra Correia
César Augusto Souza de Andrade	Maria Danielly Lima de Oliveira
Charles Fernandes dos Santos Simões	Marina Ferraz Cordeiro
Cheysa Arielly Biondo	Marina Galdino da Rocha Pitta
Christian Robson de Souza Reis	Mayara Marques Carneiro da Silva
Cristina Maria de Souza Motta	Mércia Liane de Oliveira
Daniella Silva Bezerra	Michelly Cristiny Pereira
Diego Rodrigues Cravo Teixeira	Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Douglas Carvalho Francisco Viana	Mônica Felts de La Roca Soares

Natalia Cassia do Espirito
Santo Nascimento
Priscilla Stela Santana de
Oliveira
Rafael Dhalia
Renata Juliana Marques
Cavalcanti
Renata Lins Carneiro
Leão
Renata Virgínia
Cavalcanti Santos
Rodrigo Lisboa Nunes
Carneiro
Roeckson Carlos Peixoto
Silva
Sandro de Sousa Leal
Sarah Maria Nigro
Sarmento
Simão Kalebe Silva de
Paula
Tacilene Luzia da Silva
Thais Moreira Alexandre
da Silva
Thiago David dos Santos
Silva
Tiago Rafael de Sousa
Nunes
Valdênia Maria Oliveira
de Souza
Vanessa da Silva Luna
Vanessa Vilches
Sant'anna

Vitor Alfredo de Santana
Silva
Wagner Luis Mendes de
Oliveira
Waleska Pereira Viana

Dedicatória

À Suely Lins Galdino (em memória), que simboliza o espírito inovador, que jamais desiste, e persiste nos seus ideais até o último segundo, sempre com um sorriso e vontade férrea de trabalhar.

Prefácio

Quando a Novartis me apontou como diretor da planta da fábrica de vacinas planejada para Pernambuco em 2011, a capacitação e o desenvolvimento da futura mão de obra para esta fábrica era um fator chave do sucesso. Assim, a Novartis estabeleceu contatos com a UFPE com o objetivo de criar programas de capacitação específicos para este fim, outrora ausentes no Nordeste do Brasil, respondendo às necessidades da indústria biotecnológica. Com a Profa. Suely Lins Gadino, encontramos uma parceira ideal e cheia de entusiasmo para criar este primeiro programa na Região. Em 2012, eu, a Profa. Suely e o Prof. César Augusto Souza de Andrade viajamos juntos para os Estado Unidos, com a finalidade de conhecer o Centro de Treinamento e Educação em Biotecnologia BTEC (Biotechnology Training and Education Center) em Raleigh, Carolina do Norte. Esta instituição, que teve grande importância no desenvolvimento da indústria biotecnológica naquele Estado, também tem um laboratório de tamanho real para simulação de operações de produção, permitindo um treinamento muito efetivo. Assim, nasceu a ideia do BTEC do Brasil e a colaboração entre o BTEC dos Estados Unidos e a UFPE no Brasil.

A Profa. Suely tragicamente faleceu logo depois, mas deixou um legado muito importante. Sua trajetória continuou sob a direção da sua filha, a Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta, bem como do Prof. César. Desta forma, entre a Novartis e a UFPE, foram criados

programas de treinamento e capacitação, com a finalidade de servir à futura fábrica de vacinas. Infelizmente, o projeto da fábrica parou em seguida, consequência da venda da divisão de vacinas pela Novartis em nível internacional. Contudo, importantes programas de formação tiveram prosseguimento e a UFPE continua perseguindo o projeto de um polo biofarmacêutico no Estado de Pernambuco.

Para mim, é uma grande alegria e uma honra ver se desenvolver o que foi criado anos atrás. Gostaria de agradecer à Profa. Maira e ao Prof. César, que sempre foram parceiros fiéis e muito competentes, e espero que o sonho da indústria biotecnológica em Pernambuco se realize. Também gostaria de parabenizar os estudantes que concluíram os seus trabalhos neste programa, fruto de um projeto comum entre a UFPE e a Novartis do Brasil, e que podem ser conferidos neste livro.

Markus Schneider
Novartis

AGRADECIMENTOS

Esta obra só se tornou possível em razão do apoio recebido pela Novartis para realizar o Curso de Pós-Graduação Lato Sensu (Especialização) em Inovação Tecnológica e Formação Qualificada FARMA-BIOTEC. O curso, coordenado pelos professores Maira Galdino da Rocha Pitta e César Augusto Souza de Angrade, teve como objetivo formar recursos humanos qualificados e muito bem treinados para atuar na planta industrial de produção de fármacos e medicamentos. Fornecendo treinamento prático e teórico especializado na formação de treinadores para a indústria farmacêutica e farmacoquímica.

Um agradecimento ao apoio da Universidade Federal de Pernambuco e do Instituto Suely Galdino.

Aos colegas autores Flaviana Alves, Anderson Rodrigues, Kamila Vilar, Breno Caldas de Araújo e Wagner Oliveira que revisaram boa parte do texto, sugeriram melhorias e permitiram o aprimoramento da obra.

Aos docentes, monitores e coordenadores do Curso de Pós-Graduação Lato Sensu (Especialização) em Inovação Tecnológica e Formação Qualificada FARMA-BIOTEC.

Um agradecimento muito especial a Markus Schneider, incansável nas inúmeras atividades que envolveram este esforço ao longo de três anos. E também a equipe da Novartis que participou do projeto.

Ao secretário do curso Paulo Germano.

E por fim, mas não menos importante, a todos os profissionais que realizaram o Curso de Pós-Graduação Lato Sensu (Especialização) em Inovação Tecnológica e Formação Qualificada FARMA-BIOTEC.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: PRODUÇÃO DO ANTÍGENO p24 DE HIV-1 EM <i>LEISHMANIA TARENTOLAE</i> Adalúcia da Silva; Gustavo Barbosa de Lima; Tiago Rafael de Sousa Nunes; Christian Robson de Souza Reis; Antonio Carlos de Freitas.	15
CAPÍTULO II: PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS Amanda Florencio Silva; Anderson Rodrigues de Almeida; Maria Danielly Lima de Oliveira; César Augusto Souza de Andrade.	41
CAPÍTULO III: MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS PRODUZIDOS EM INSTITUIÇÕES PÚBLICAS DO BRASIL Ana Cláudia Carvalho; César Augusto Souza de Andrade; Marina Galdino da Rocha Pitta; Maria Danielly Lima Oliveira.	64
CAPÍTULO IV: PLANOS DE AMOSTRAGEM NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA Bárbara Kerolen Silva; Breno Caldas de Araújo; Mônica Felts de La Roca Soares.	71
CAPÍTULO V: BIOMARCADORES NO PROCESSO DE P&D DE NOVOS MEDICAMENTOS: APLICAÇÃO EM LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS Camila Ficker Sabino Santos; Breno Caldas de Araújo; Maira Galdino da Rocha Pitta; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira.	95
CAPÍTULO VI: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM INDÚSTRIAS DE BIOTECNOLOGIA Charles Fernandes dos Santos Simões; Simão Kalebe Silva de Paula; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly	112

Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta.	
CAPÍTULO VII: EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA DENGUE Cheysa Arielly Biondo; Kamila de Melo Vilar; Klecia Cassemiro; Rafael Dhalia; Luiz Alberto Lira Soares.	128
CAPÍTULO VIII: ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS EM FORMULAÇÕES VACINAIS Daniella Silva Bezerra; Diego Rodrigues Cravo Teixeira; César Augusto Souza de Andrade; Marina Galdino da Rocha Pitta; Maria Danielly Lima de Oliveira.	147
CAPÍTULO IX: USO DE AGENTES SANITIZANTES NA INDÚSTRIA DE BIOTECNOLOGIA Ellison Neves de Lima; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta.	171
CAPÍTULO X: ABORDAGENS IMUNOBIOLOGICAS NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER Gabriela Souto Vieira de Mello; Marina Ferraz Cordeiro; Renata Virgínia Cavalcanti Santos; Michelly Cristiny Pereira; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.	183
CAPÍTULO XI: ANÁLISE DE FATORES RELEVANTES E TÉCNICAS BIOANALÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA PRODUÇÃO DE BIOMEDICAMENTOS Ingrid Tavares de Lima; Douglas Carvalho Francisco Viana; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta.	208
CAPÍTULO XII: TRATAMENTO DE ÁGUA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA Laís Regina de França Alves; Simão Kalebe Silva de Paula; Luiz Alberto Lira Soares	235
CAPÍTULO XIII: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMAS HETERÓLOGOS PROCARIOTO E EUCARIOTO Laís Rodrigues Moura; Lilia Vieira Galdino; Tiago Rafael de Sousa Nunes; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Maira Galdino da Rocha Pitta; Michelly Cristiny Pereira.	251
CAPÍTULO XIV: DESENVOLVIMENTO DE	261

<p>SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE BIOFÁRMACOS PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA Ludmila de Araújo Costa; Douglas Carvalho Francisco Viana; César Augusto Souza de Andrade.</p>	
<p>CAPÍTULO XV: CITOTOXICIDADE DE SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS Maria Andreza Bezerra Correia; Thiago Ubiratan Lins e Lins; Vitor Alfredo de Santana Silva; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta; Cristina Maria Souza Motta.</p>	288
<p>CAPÍTULO XVI: PARECER TÉCNICO-CIENTÍFICO: EFICÁCIA E SEGURANÇA DO SECUKINUMABE VERSUS INFLIXIMABE NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATÓIDE Mayara Marques Carneiro da Silva; Priscilla Stela Santana de Oliveira; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta.</p>	301
<p>CAPÍTULO XVII: PROGRAMA DEMONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASSIFICADAS Renata Lins Carneiro Leão; Anderson Rodrigues de Almeida; Natalia Cassia do Espirito Santo Nascimento; Mércia Liane de Oliveira; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira; Maira Galdino da Rocha Pitta.</p>	310
<p>CAPÍTULO XVIII: PROCESSOS ENVOLVIDOS PARA O DESCARTE DE REJEITOS E RESÍDUOS GERADOS POR UMA INDÚSTRIA DE VACINAS E SOROS NO BRASIL: UM RELATO DE CASO Rodrigo Lisboa Nunes Carneiro; Anderson Rodrigues de Almeida; Vanessa Vilches Sant'anna; Michelly Cristiny Pereira.</p>	327
<p>CAPÍTULO XIX: EFICÁCIA E SEGURANÇA DO OMALIZUMABE NO TRATAMENTO DA ASMA GRAVE Roekson Carlos Peixoto Silva; Priscilla Stela Santana de Oliveira; Valdênia Maria Oliveira de Souza; Maira Galdino da Rocha Pitta.</p>	350

<u>CAPÍTULO XX:</u> A MICROBIOLOGIA COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS Sarah Maria Nigro Sarmento; Lilia Vieira Galdino; Bruno Severo Gomes; Marina Galdino da Rocha Pitta.	361
<u>CAPÍTULO XXI:</u> CONTAMINAÇÃO E ADAPTAÇÃO MICROBIANA EM BIOFÁRMACOS: UM ESTUDO DE REVISÃO Tacilene Luzia da Silva; Diego Rodrigues Cravo Teixeira; Maira Galdino da Rocha Pitta; Marina Galdino da Rocha Pitta.	370
<u>CAPÍTULO XXII:</u> AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS Thiago David dos Santos Silva; Antônio Felix da Silva Filho; Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho; Maira Galdino da Rocha Pitta; Michelly Cristiny Pereira; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo	383
<u>CAPÍTULO XXIII:</u> UMA REVISÃO SOBRE VETORES VACINAIS VIVOS NOTRATAMENTO DE DOENÇAS CAUSADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) Thais Moreira Alexandre da Silva; Flaviana Alves dos Santos Filipe Colaço Mariz; Antonio Carlos de Freitas.	408
<u>CAPÍTULO XXIV:</u> ESTUDO DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS: ALTERAÇÃO PÓS-REGISTRO Waleska Pereira Viana; Tiago Rafael de Sousa Nunes; José Lamartine Soares Sobrinho.	424
<u>CAPÍTULO XXV:</u> ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA Wagner Luis Mendes de Oliveira; Bruno Severo Gomes.	440
<u>CAPÍTULO XXVI:</u> CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS: CONTAMINANTES E PURIFICAÇÃO Renata Juliana Marques Cavalcanti; Tiago Rafael de Sousa Nunes; César Augusto Souza de Andrade; Cristina Maria de Souza Motta.	450

<u>CAPÍTULO XXVII: AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS <i>DOWNSTREAM</i> PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS</u> Sandro de Sousa Leal; Flaviana Alves dos Santos; Maria Danielly Lima de Oliveira; César Augusto Souza de Andrade.	463
<u>CAPÍTULO XXVIII: ABORDAGEM DO BIOPROCESSO EM ESCALA INDUSTRIAL, COM ÊNFASE NAS DIFICULDADES NAS ETAPAS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> QUE POSSAM COMPROMETER A OBTENÇÃO DO PRODUTO FINAL</u> Vanessa da Silva Luna; Douglas Carvalho Francisco Viana; Maira Galdino da Rocha Pitta; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo; Michelly Cristiny Pereira.	479

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DO ANTÍGENO p24 DE HIV-1 EM *LEISHMANIA TARENTOLAE*

Adalúcia da Silva¹

Gustavo Barbosa de Lima¹

Tiago Rafael de Sousa Nunes²

Christian Robson de Souza Reis¹

Antonio Carlos de Freitas³

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/CPqAM),
Departamento de Microbiologia.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental
(LEMTE), Departamento de Genética – UFPE.

E-mail de

contato:chreis@cpqam.fiocruz.br
adaluciasilva9@gmail.com

RESUMO – *A Síndrome da Imunodeficiência Humana é uma das principais doenças infecciosas do mundo, representando um desafio mundial. Seu agente etiológico é o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um retrovírus, transmitido por via sexual, vertical e transfusional. O diagnóstico e monitoramento da*

*infecção são parâmetros importantes para notificação e para avaliação da efetividade das terapias antivirais. O diagnóstico do HIV tem avançado muito pelo uso de antígenos recombinantes que permitem reconhecer anticorpos produzidos por pacientes infectados com este vírus. Um dos antígenos de HIV de maior interesse diagnóstico é a proteína do núcleo capsídeo p24 por aparecer precocemente e permanecer na corrente sanguínea por um longo período de tempo. Porém a proteína que é utilizada nos kits nacionais de diagnóstico é importada, o que aumenta significativamente o preço destes kits, e a produção de antígenos virais em células procarióticas em muitas situações não é bem-sucedida, justificando o desenvolvimento de novos estudos que utilizem sistemas de expressão alternativos para obtenção de proteína viral em grandes quantidades, de forma rápida e eficaz. O objetivo desse trabalho é expressar e purificar a proteína p24 do HIV utilizando para isso o sistema de expressão em *Leishmania tarentolae*. O gene da proteína p24 do HIV 1 foi amplificado por PCR e clonado no vetor pGEM-T-easy e sequenciado para verificar a integridade da sequência gênica. Em seguida, o gene foi subclonado no vetor comercial pLEXSY hyg2 que é utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *L. tarentolae*. A partir das construções plasmidiais obtidas foram obtidos cassetes de integração gênica por meio de digestão dos vetores e em seguida culturas de *Leishmania tarentolae* foram transfectadas permitindo a obtenção de duas linhagens transgênicas: uma de expressão episomal e outra de expressão constitutiva. Para avaliação da*

expressão protéicas, extratos celulares foram fracionados em gel SDS PAGE 20% que permitiu a visualização da proteína expressa no tamanho predito, resultado confirmado por Western blot utilizando anticorpos anti-p24. Em conclusão, este trabalho conseguiu realizar a expressão da proteína recombinante p24 do HIV 1 em Leishmania tarentolae, e esse novo sistema de expressão pode ser utilizado para expressão de outros antígenos virais.

Palavras chave: HIV; L. tarentolae; expressão heteróloga; pLEXSY-hyg2

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) é uma das principais doenças infecciosas do último século e representa um desafio mundial, atingindo cerca de 60 milhões de pessoas e causando em torno de 39 milhões de mortes em todo o mundo. Ela possui como agente etiológico o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um retrovírus da família Lentiviridae, transmitido por via sexual, vertical e transfusional (WHO, 2014; UNAIDS, 2010). Entre os dois tipos de HIV (1 e 2), o HIV-1 é mais virulento e é responsável pela maioria das infecções globais por HIV (CHAKRABORTY et al., 2014).

O diagnóstico e monitoramento da infecção por HIV são parâmetros para notificação do início e para avaliação da efetividade das terapias antivirais Apesar do

vírus ser o foco principal de diversas pesquisas, ainda não há uma terapia curativa que seja efetiva contra o patógeno relacionado. Sendo assim, a prevenção e o diagnóstico são os meios mais efetivos para controlar essa epidemia (BIANCOTTO et al., 2009).

Um dos antígenos de HIV de maior interesse diagnóstico é a proteína do nucleocapsídeo p24 (TANG et al., 2010) que possui epítomos de células B e com isso produz forte resposta imune humoral (FORSTER, 2003). Os anticorpos induzidos pela p24 podem ser detectados de uma a duas semanas após a infecção e podem ser utilizados tanto como marcadores de infecção recente como indicadores da replicação viral e para prognóstico clínico (LY et al., 2000).

O objetivo desse trabalho é expressar e purificar a proteína p24 do HIV utilizando o sistema de expressão em *Leishmania tarentolae*. É importante ressaltar que *L. tarentolae* é um sistema de expressão eucariótico heterólogo que vem sendo cada vez mais utilizado para produção de proteínas recombinantes por diversos fatores – principalmente por efetuar modificações pós-traducionais nas proteínas produzidas. Outra grande vantagem é que a *L. tarentolae* não é patogênica a humanos, sendo encontrada no réptil *Tarentolamauritanica* (RAYMOND et al., 2011; BASILE; PETICCA, 2009).

Este trabalho visa a obtenção das proteínas virais recombinantes e conseqüentemente a avaliação da utilização do sistema de expressão em *L. tarentolae*,

podendo ser expandido para outros vírus ou para proteínas que não sejam facilmente expressas em *E. coli* ou que necessitem de modificações pós-traducionais que garantirão um melhor dobramento das proteínas aumentando assim o reconhecimento destas proteínas no diagnóstico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amplificação do gene p24 do HIV 1 por PCR

A estratégia para amplificação da porção codificante dos genes de interesse a partir do plasmídeo pUC57 baseou-se na técnica de PCR. No desenho dos primers específicos para amplificação do gene p24 do HIV 1 foi utilizado o programa ApE 2.0.47. O Programa Primer-BLAST® foi utilizado para verificar temperatura de anelamento, o conteúdo de pares de bases citosina-guanina e a possibilidade de formação de grampos e estruturas secundárias. Aos primers forward e reverse obtidos foram adicionados os sítios para as enzimas de restrição *Nco* I / *Xba* I (upstream) e *Nhe* I / *Kpn* I (downstream). As sequências destes primers podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers para amplificação do p24 do HIV 1.

Primers F	CAACCATGGCTCTAGACGCTAGTCCTAGGACCCTG
-----------	-------------------------------------

PrimersR	CAAGGTACCGCTAGCTCAAGCGGCCGCGCAGG
----------	----------------------------------

Os fragmentos de foram amplificados por PCR utilizando a enzima Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs), na presença de tampão específico, adicionado de 0,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM dos primersforward e reverse e 0,5µL de DNA contendo a sequência do gene p24. As condições de tempo e temperatura das reações foram: 98°C por 30 segundos para desnaturação; de 65°C a 55°C (decrecente – touchdown) por 30 segundos para anelamento e 1 minuto para a extensão a 72°C, com 5 minutos a 72°C para extensão final, as reações foram executadas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Eppendorf).

Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) para visualização da eficiência e especificidade da reação. Após a confirmação dos tamanhos os fragmentos foram recortados e purificados utilizando kit illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) segundo as recomendações do fabricante.

2.2 Reação de adenilação

Os fragmentos gênicos da PCR foram adenilados nas pontas com deoxiadenosinatri-fosfato (dATP) por ação enzima Taq DNA polimerase (Promega). As reações de adenilação foram executadas em um termociclador (Eppendorf), tendo o volume final de 10 μ L por reação, sendo 5 μ L do produto de PCR purificado, 1 μ L de tampão específico 10x contendo MgCl₂, 2 μ L de dATP a 1 mM e 1 μ L de enzima Taq DNA polymerase (5U). As reações foram incubadas por 30 minutos a 72°C no termociclador.

2.3 Clonagem do gene p24 do HIV 1no vetor pGEM-T-Easy e sequenciamento

O fragmento p24 do HIV1 adenilado foi inserido no vetor pGEM-T-Easy (Promega) através de uma reação de ligação. Cada mistura de ligação foi preparada empregando-se um volume final de 10 μ L constituídos de 2 μ L produto de PCR adenilado a 100 ng/ μ L -1, 0,5 μ L de plasmídeo pGEM-T-Easy e 0,5 de Tampão T4 Ligase. Água Milli-Q foi utilizada para completar o volume total. Esta reação foi mantida a 20°C por 24 horas. As misturas de ligação foram utilizadas na transformação por choque térmico de células de *E. coli* DH10B (Invitrogen), competentes por tratamento com CaCl₂.

2.4 Protocolo de transformação bacteriana

Alíquotas de 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH10B foram acrescidas de DNA plasmidial de interesse (2-5 μ L) foram incubadas em gelo por 30

minutos. Foram, então, incubadas por 45 segundos em banho Maria a 42 °C e, imediatamente após, as reações foram novamente incubadas em gelo durante 2 minutos.

Acrescentou-se a cada amostra 950 µL de meio SOC líquido estéril. As culturas foram, então, incubadas em Shaker a 37 °C com agitação de 200 rpm por uma hora. Após essa etapa, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a temperatura ambiente a 2500 g.

Retirou-se 800 µL do sobrenadante e os 200 µL restantes foram utilizados para ressuspender o sedimento bacteriano. Os 200µL foram transferidos para placas contendo meio LB sólido contendo o antibiótico Ampicilina na concentração de 100 µg/mL, 10 µL de X-Gal (5-bromo4-cloro-3-indolil-β-D-galactopyranosídeo) a 50 mg/mL e 30 µL de IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) a 0,5 M por 16-18 horas em estufa a 37°C.

2.5 Extração de DNA plasmidial

Após o período de incubação, algumas colônias brancas resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. As colônias previamente selecionadas foram repicadas, individualmente, em tubos estéreis para cultivo de bactérias contendo 2 mL de meio LB líquido (sem ágar) suplementado com o antibiótico ampicilina a 100 mg/mL. Os tubos foram incubados a 37°C por 16 horas, sob agitação de 250 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi centrifugada a ~7000 g por 10 minutos a 4 °C e ao fim o sobrenadante foi

descartado. O sedimento bacteriano foi reconstituído em 100 μL de GTE (EDTA 50mM pH 8,0, Tris-HCl 25mM pH8,0, Glicose 50mM), seguido da adição 200 μL de NaOH 0,2 M / 1% SDS e incubação por 5 minutos no gelo. Nesta etapa foi adicionado 150 μL de tampão acetato de potássio (3M CH_3COOK / 2 M CH_3COOH pH 4,8) e a amostra foi incubada no gelo por 5 minutos. Após centrifugação por 10 minutos, ~ 7000 g a temperatura ambiente, transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e foi adicionando 800 μL de etanol 100%. Nessa fase de precipitação os tubos foram colocados por 30 minutos ou overnight a -20°C , seguido de centrifugação por ~ 7000 g a 4°C . O sedimento de DNA foi reconstituído em 30 μL de água contendo RNase (10 mg/mL) e incubado a 55°C por 15 minutos para ação da enzima.

Para a confirmação da clonagem, a primeira análise de restrição foi realizada empregando-se um volume final de 10 μL constituídos de 0,8 μL dos DNAsplasmidiais a 100 ng/ μL , 1 μL da enzima EcoRI e 1 μL do tampão de enzima específico (10X), (New EnglandBiolabs) e água Milli-Q para completar o volume total. As reações foram mantidas a 37°C em estufa por 4 horas. As digestões obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) para visualização da eficiência e especificidade da reação.

2.6 Sequenciamento de DNA automático

Após confirmação dos tamanhos dos insertos por digestão, construções selecionadas foram submetidas ao

sequenciamento de DNA, que foi realizado utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) e os produtos purificados com Etanol/EDTA (Applied Biosystems®), ambos os métodos seguindo as instruções do fabricante. Todos os clones foram analisados através do sequenciador de DNA automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM / FIOCRUZ. Após o sequenciamento, para verificar a integridade da sequência obtida, esta foi submetida a uma busca em bancos de dados públicos como NCBI através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.7 Subclonagem de genes selecionados em vetor de transfecção pLEXY Hig2

Para a digestão do pLEXY e do pGEM-T-Easy foram utilizados 1000 ng de DNA plasmidial, 5 µL de tampão de reação (tampão D, Promega), 0,5 µL de cada uma das enzimas de restrição (*Nco*I e *Nhe*I, ambas na concentração de 10 U/µL) e H₂O q.s.p 50 µL. As digestões ocorreram em duas etapas sequenciais, uma para cada enzima. As amostras foram incubadas por 16 h em banho a 37°C. Após esse processo, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Syber Safe (Invitrogen) e as bandas correspondentes ao pLEXY e os insertos foram purificadas, como descrito anteriormente.

Após, foi realizada a ligação em três diferentes microtubos de 0,6mL para cada um dos genes nas duas

situações (secretório e citosólico) com 1 μL de plasmídeo (50 $\eta\text{g} / \mu\text{L}$), 1 μL de tampão T4 DNA ligase 10x, 0,5 μL da enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs® 400 U/ μL) e quantidades diferentes de cada fragmento (1° tubo – 10 ηg no 2° tubo – 50 ηg) e água para volume final de 10 μL . Como controle negativo, não foi adicionado fragmento no 3° tubo. Aligação ocorreu por 16 horas a temperatura ambiente. Para obtenção dos plasmídeos contendo os insertos de interesse, cepas de bactérias *E. coli* DH10B foram transformadas por choque térmico como descrito no item 2.4. Para obtenção do cassete integrativo, o vetor pLEXSY contendo o gene de interesse foi digerido com a enzima SwaI, e o produto da digestão foi corrido em gel de agarose 1% e o fragmento de 6.000pb foi purificado e utilizado para transfecção.

2.8 Confirmação da presença do inserto

Para confirmar a presença do inserto nos clones obtidos, montou-se uma reação com 500 ng de DNA plasmidial, 1 μL de tampão de reação (tampão D, Promega) e 0,5 μL das enzimas de restrição, *Nco*I e *Nhe*I.

2.9 Cultivo celular e transfecção de *L. tarentolae*

As células de *L. tarentolae* em sua forma promastigota foram cultivadas em meio Schneider com pH 7,2, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 0,2 % de hemina e 1 % de penicilina e estreptomicina, sendo repicadas a cada 3 dias em tubos garrafas de cultura de 50 ml. O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer, sendo mantidos em fase exponencial de crescimento por

meio de repasses sucessivos. Para a pré-seleção/seleção e manutenção das linhagens transgênicas foi empregado o antibiótico higromicina (Invitrogen) na proporção de 0,08 mg/ml de meio.

Para transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. tarentolae* em fase exponencial foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos em tubos cônicos de 15 ml. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 ml de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM glicose e pH 7,05), homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições anteriores, sendo o sedimento ressuspensionado em 400 μl do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm, as quais contém os plasmídeos em uma quantidade de 2 a 5 μg . Para controle negativo são adicionados apenas os parasitas a cuveta, sem a presença de DNA. As cuvetas, então, permaneceram em gelo por um período de 15 minutos.

O conjunto foi submetido a eletroporação através do aparelho BioRad Gene Pulser II (BioRad), sendo realizados seis pulsos elétricos de 450 V, capacitância de 500 μF , com 200 ms de intervalos e 300 ms de duração. Após os pulsos, o material é transferido para garrafas de cultura de 50 ml contendo 5 ml meio Schneider pH 7,2 e incubados a 26°C por 24 horas. É realizada então a pré-seleção adicionando-se o antibiótico Higromicina. A cultura é incubada novamente a 26°C por 24 horas. Após esse período é realizada a seleção final, onde 0,5 ml das culturas pré-selecionadas foram transferidas para novas

garrafas contendo 4,5 ml de meio Schneider pH 7,2, sendo adicionados novamente os antibióticos necessários. As culturas foram incubadas em estufa a 26°C por aproximadamente 10 a 15 dias ou até apresentarem crescimento celular suficiente para realização de repasses celulares.

Após esse procedimento, foi realizada a seleção clonal (ao menos 3 clones) dessas linhagens, em placas com Schneider sólido. A partir desses clones, pudemos realizar os ensaios de expressão protéica deste trabalho.

2.10 Extração de DNA e PCR diagnóstico dos clones de *L. tarentolae* transfetados

Com o objetivo de avaliar a correta inserção do cassette de expressão pLEXSU/gene p24 no locus do cromossomo da célula hospedeira, foi realizado um ensaio de PCR. Para a reação de PCR utilizou-se o material genômico extraído das células de *L. tarentolae* provenientes da seleção após a transfecção com as construções lineares.

Para extração do material genômico, o reagente DNAzol da Life Technologies Invitrogen foi utilizado de acordo com as orientações do fabricante para isolamento de DNA genômico a partir de culturas celulares. A partir da do DNA genômico extraído das células selecionadas de *L. tarentolae*, foram realizadas duas PCRs com primers específicos.

A primeira PCR diagnóstico utilizou os primersforward F3001(hibridiza com a região 5'ssu

presente somente no cromossomo da célula hospedeira) e o reverse A1715 (hibridiza com a região utr1 presente no cassete de inserção pLEXSY/gene p24), para gerar o fragmento de 1.000pb, correspondente às regiões 5'ssu do cromossomo celular + utr1 do cassete de expressão. Como controle negativo da reação foi utilizado o material genômico extraído de células selvagens.

Para a reação de segunda PCR diagnóstico foram utilizados os primers forward A3804 (hibridiza com a região correspondente ao gene *hyg* presente no cassete de inserção) e o reverse F3002 (hibridiza com a região 3'ssu presente no cromossomo da célula hospedeira), a fim de se observar a formação de um fragmento de 2.100 a 2.900pb, correspondente às regiões *hyg* do cassete de expressão + 3'ssu do cromossomo celular.

Os fragmentos de foram amplificados por PCR utilizando a enzima Phusion DNA Polymerase (New EnglandBiolabs) a programação no termociclador foi estabelecida para 94°C por 5min, e mais 40 ciclos de: 94°C por 45 seg para a desnaturação das fitas, 60°C por 30seg para o anelamento dos primers e 72°C por 1min e 30seg para a reação de extensão da polimerase. Ao fim de todos os ciclos, mais uma etapa de extensão adicional, de 72°C por 10min, foi realizada.

2.11 Ensaios de Western Blot

Os extratos protéicos obtidos a partir do cultivo de *L. tarentolae* foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e transferidos para membrana de PVDF (100 mA por 1h). Esta foi bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris-

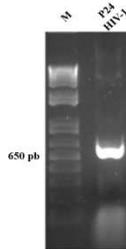
HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05% em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-p24 na concentração 1:5.000 em solução de composição igual à usada para o bloqueio. Após três lavagens de 10 minutos em solução de Tween-20 a 0,05% em TBS, houve mais uma incubação, desta vez com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase) numa diluição de 1:10.000 na mesma solução que a incubação anterior, por uma hora. Esta incubação foi seguida de três lavagens de 10 minutos para retirada do excesso do segundo anticorpo.

A visualização final foi feita através de uma reação de quimioluminescência (ECL) e exposição a filme Biomax Light (da Kodak). Tal reação utilizou 25 mL de solução quimioluminescente (25 mL de luminol a 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5, adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03%).

3. RESULTADOS

Na reação de PCR, o DNA plasmidial pUC57 contendo o gene p24 do HIV 1, foi utilizado para obtenção do fragmento do gene de interesse. A figura 1 mostra o produto da reação de amplificação de PCR com o fragmento de 669pb correspondente ao do gene p24.

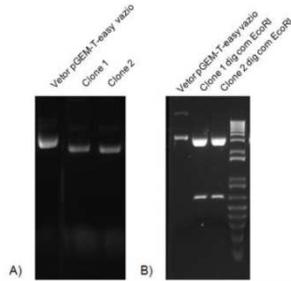
Figura 1 – Amplificação do fragmento gênico por PCR. Fragmento gênico correspondente ao p24 do HIV 1. M: Marcador de peso molecular.



O fragmento isolado foi purificado e o produto gênico que codifica a proteína de interesse foi clonado no vetor pGEM-T-Easy (Figura 2). Como controle, o vetor pGEM-T-Easy foi utilizado como marcador do tamanho dos possíveis clones recombinantes. Os clones que apresentaram tamanho maior que o plasmídeo controle foram digeridos com a enzima *EcoRI*.

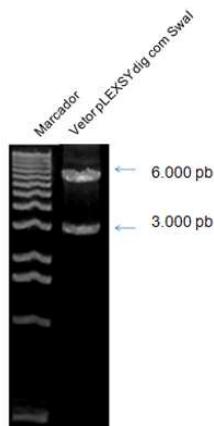
Após a clonagem do gene p24 do HIV 1 no vetor pGEM-T-easy, foi realizada a extração plasmidial das construções selecionadas em larga escala para obtenção de DNA necessário para utilização nas sub-clonagens em vetor de expressão pLEXY Hig2. Seguido as extrações plasmidiais, os DNAs foram então digeridos com as enzimas *NcoI* e *NheI* para liberação do fragmento gênico, sendo posteriormente ligados ao vetor de expressão. Após a transformação em *E. coli* DH10B, foram realizadas minipreparações de clones obtidos, confirmados por provas de digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *NheI*, liberando assim o fragmento de tamanho esperado.

Figura 2 – Clonagem e digestão do gene p24.



A construção plasmidial pLEXY/p24 foi linearizada pela digestão com a enzima de restrição *SwaI* (Figura 3). Após a eletroforese em gel de agarose 1% observou-se a formação de duas bandas no gel: uma de aproximadamente 3Kpb, característica da região correspondente a origem de replicação de *E. coli* e do gene de resistência *bla*; da banda de interesse com aproximadamente 6Kb, representando o restante do cassette de expressão que será integrado ao DNA do parasita.

Figura 3 – Resultado da digestão com *Swa*I da construção pLEXSY/p24. Eletroforeses em gel de agarose 1%, marcador 1Kb Plus DNA ladder.



Os DNAs obtidos foram utilizados na transfecção de células de *L. tarentolae* em dois grupos: o primeiro, com o plasmídeo circular que fica na célula forma episomal e o segundo, com o plasmídeo linearizado que permite que a construção seja integrada ao DNA das células hospedeiras, tanto circular como na forma linearizada. Após o período de seleção, foi obtida uma linhagem de *L. tarentolae* com expressão episomal e, após seleção em meio sólido, três clones celulares *da linhagem* expressando constitutivamente a proteína de interesse.

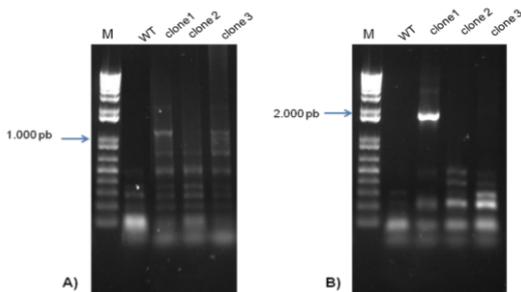
As reações de PCR 1 e 2 serviram para constatar a correta inserção do cassete de expressão do gene p24 no locus gênico das células transfectadas com as construções

linearizadas. Para isso, foram utilizados os pares de primers específicos forward F3001 e o reverse A1715 na primeira reação e o par forward A3804 e o reverse F3002 na reação segunda. Como controle negativo foi utilizado o material genômico extraído de células de *L. tarentolae* selvagens.

Visto que os primers forward F3001 e o reverse F3002 são específicos para a região *ssu* do cromossomo da célula, espera-se observar a formação de um fragmento de aproximadamente 1.000pb e de 2.100-2.900pb nas primeiras e segunda reações de PCR respectivamente (Figura 4).

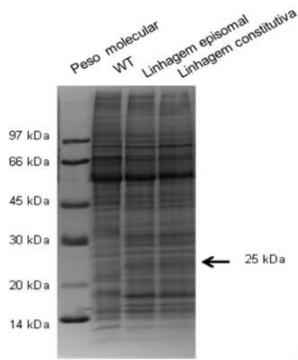
Foram observadas bandas provenientes das amplificações específicas no clone 1, bem como a presença de bandas resultantes de amplificações inespecíficas nos clones e no selvagem. Esse resultado confirma a presença do cassete de expressão inserido na região do DNA celular correspondente ao locus da subunidade menor ribossomal 18S, em pelo menos um clone celular; este clone foi selecionado para os ensaios seguintes.

Figura 4 – Produto de PCR diagnóstico na primeira (a) e segunda (b) reações. Em ambos, linha 1: marcador 1Kb DNA ladder (Invitrogen), linha 2: controle negativo com produto da reação com o material extraído da célula selvagem, linhas 3,4 e 5: produtos das reações com o material genômico dos clones transfectados com o pLEXSY/p24 linear.



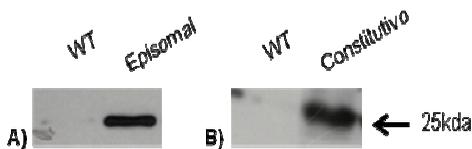
A avaliação da expressão da proteína recombinante foi realizada por resolução de alíquotas dos extratos celulares em gel SDS-PAGE 20%, corado com Azul de Coomassie (Figura 5). Foi possível observar diferenças entre a colônia selvagem e os clones recombinantes, sendo representadas por bandas mais espessas, indicativo da expressão da proteína de interesse.

Figura 5 – Eletroforese de gel SDS PAGE 20%. A banda indica expressão da proteína no tamanho esperado; p24HIV1: 25kDa.



A confirmação da expressão das proteínas se deu por Western Blot, utilizando o anticorpo anti-p24.

Figura 6 - Análise da expressão da proteína p24 de HIV 1. Extratos de células procíclicas na fase exponencial transfectadas com os plasmídeos em **A)** circular e **B)** linear codificando a proteína de interesse foram fracionados em SDS-PAGE 20% e submetidos a ensaios de Western blot utilizando anticorpo policlonal dirigido contra a proteína p24.



4. DISCUSSÃO

L. tarentolae tem sido utilizada com sucesso para expressar proteínas solúveis citosólicas e secretadas; este sistema faz uso da elevada taxa de transcrição de RNA polimerase I, usando vetores que se integram ao cassete de expressão recombinante ao locus do rRNA no genoma. Também é possível executar outras modificações pós-transcricionais, tais como a incorporação de ligações dissulfeto e o processamento de sequências de sinal, e pode lidar com desafios de dobramento de proteínas mais complexas, como o fator de crescimento epidérmico humano SOD1 (GAZDAG et al., 2010).

Outras proteínas complexas que têm sido um desafio para expressar em *E. coli*, tais como a proteína da capsídeo do vírus a hepatite E, foi expresso com sucesso em *L. tarentolae*, utilizando-se o vetor pLEXY, tendo resultados bastante satisfatórios (BAECHLEIN et al., 2013).

Pion et al., (2014) utilizaram o pLEXY para produção de seis diferentes proteínas hemaglutinina do vírus da gripe em *L. tarentolae*, e classificaram a expressão e purificação das proteínas hemaglutinina como fáceis e que as proteínas hemaglutinina eram imunogênicos em murinos, mostrando que *L. tarentolae* pode ser uma alternativa para as vacinas da gripe à base de ovo.

Saljoughian et al., (2013) propuseram a utilização da *L. tarentolae* recombinante como vacina viva contra a leishmaniose visceral. Para isto, o parasita expressando o antígeno *L. donovani* A2 juntamente com proteínases cisteína (CPA e CPB, sem sua incomum extensão C terminal (CEC-CTE)) com nanopartículas lipídicas sólidas (cSLN) atuando como um adjuvante, promovem imunidade protetora do tipoTh1, devido aos elevados níveis de produção de IFN- γ em murinos. Além disso, proteção em ratos também foi correlacionada com uma elevada produção de óxido nítrico e baixa carga parasitária. Em seu conjunto, estes resultados indicam a promessa da A2-CPA-CPB-CTE recombinante *L. tarentolae* como candidato vacina viva seguro contra a leishmaniose visceral.

O resultado mostrou-se positivo após a transferência das proteínas por SDS-PAGE e ensaio de Western Blot utilizando anticorpos contra a proteína p24 de HIV 1. Mostra-se, assim, que a proteína está sendo expressa em limites detectáveis, tanto pela coloração por Coomassie quanto pela técnica de Western Blot.

Sistemas de expressão in vitro com base em *E. coli* têm sido utilizados durante muitos anos para expressão de proteínas, porém, algumas proteínas se mostram tóxicas para a célula, formando corpúsculos de inclusão - o que dificulta a sua purificação. Algumas tentativas para a expressão de proteínas virais de HIV foram realizadas, como a fusão de fragmentos de gp41 egp120 (SOHN et al., 1996), a criação e junção de múltiplos epítomos de proteínas diferentes (TALHA et al., 2010). Todavia,

alguns destes antígenos demonstraram ausência ou baixa imunorreatividade nos testes de ELISA, demonstrando assim que alguns epítomos conformacionais e domínios proteicos podem ser necessários para o reconhecimento pelos anticorpos.

5. CONCLUSÃO

O sistema de expressão em *L. tarentolae* transfectada com o vetor de expressão pLEXSYHyg2 recombinante produziu a proteína p24 do HIV1 com sucesso nas condições descritas neste trabalho. A proteína recombinante foi reconhecida por seu respectivo anticorpo. A purificação e quantificação das proteínas produzidas neste sistema poderão ser realizadas futuramente.

6. REFERÊNCIAS

BAECHLEIN, C. et al. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmaniatarentolae* and its application in a serological assay. *Journal of Virological Methods*, v.193, p. 238, 2013.

BASILE, G., PETICCA, M. Recombinant protein expression in *Leishmaniatarentolae*. *MolBiotechnol*, v. 43(3), p. 273-278, 2009.

BIANCOTTO, A. et al. A highly sensitive and dynamic immunofluorescent cytometric bead assay for the

detection of HIV-1 p24. *J. Virol. Methods*, v. 157, p. 98-101, 2009.

CHAKRABORTY, S.; RAHMAN, T.; CHAKRAVORTY, R. Characterization of the Protective HIV-1 CTL Epitopes and the Corresponding HLA Class I Alleles: A Step towards Designing CTL Based HIV-1 Vaccine. *Advances in Virology*, p. 1-17, 2014.

FORSTER, S. Diagnosing HIV infection. *Clin Med.*, v. 3, p. 203-205, 2003.

GAZDAG, E. M. et al. Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmaniarentolae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, v. 66(8), p. 871-877, 2010.

LY, T. D., EDLINGER, C., VABRET, A. Contribution of Combined Detection Assays of p24 Antigen and Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibodies in Diagnosis of Primary HIV Infection by Routine Testing. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2459-2461, 2000.

PION, C. et al. Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in *Leishmaniarentolae*. *Vaccine*, v. 32(43), p. 5570-5576, 2014.

RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmaniarentolae* reveals loss of genes

associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.*, v. 40(3), p. 1131-1147, 2011.

SALJOUGHIAN, N. et al. Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* v. 7(4), p. 1-15, 2013.

SOHN, M. Over expression and purification of human immunodeficiency virus type 1 *env* derived epitopes in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 45, p. 211-216, 1996.

TALHA, S. M. Inexpensive Designer Antigen for Anti-HIV Antibody Detection with High Sensitivity and Specificity. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, p. 335-341, 2010.

TANG, S. et al. Characterization of immune responses to capsid protein p24 of human immunodeficiency virus type 1 and implications for detection. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 17, p. 1244-51, 2010.

UNAIDS, P. C. D. N. U. S. H. A.-. UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic. WHO Library: 2010. 364 p.

WHO. Updated November 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>. Acesso em: março 2015.

CAPÍTULO II

PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS

Amanda Florencio Silva¹

Anderson Rodrigues de Almeida²

Maria Danielly Lima de Oliveira³

César Augusto Souza de Andrade³

¹UniNovartis, Universidade Federal De Pernambuco, UFPE

²Nucleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

³Departamento de Bioquímica, UFPE

E-mail para contato: amandafsva@hotmail.com

RESUMO – *Os Biomedicamentos têm sido a principal força motriz para o crescimento da indústria farmacêutica nos últimos anos, tendo seu uso associado ao tratamento de diversos tipos de doenças, em sua maioria graves e crônicas. São representados por diversas classes de compostos, dos quais os anticorpos monoclonais constituem a maior parte. O*

desenvolvimento e fabricação desses fármacos são processos complexos que requerem controle de qualidade e caracterização rigorosos para garantir sua segurança e eficácia. Este trabalho teve como objetivo central analisar as principais técnicas utilizadas para controle de qualidade de biomedicamentos e sua caracterização. A metodologia utilizada baseou-se em Pesquisa Bibliográfica sistemática fundamentada na análise de literatura já publicada sobre o assunto. Foi possível concluir que, dada sua complexidade estrutural, a caracterização e o controle de qualidade de biomedicamentos constituem um grande desafio. Apesar do amplo espectro de diferentes metodologias disponíveis para tal finalidade, todas possuem suas limitações, de forma que uma bateria de técnicas físico-químicas e ensaios biológicos fornecendo informações complementares são necessários. Foi constatado, também, que as legislações brasileiras carecem de especificações mais direcionadas no que se refere à seleção dessas técnicas.

Palavras chave: Biomedicamentos; Caracterização; Controle de qualidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Indústria Biofarmacêutica

Os Biomedicamentos, também denominados biofármacos, medicamentos biológicos ou produtos biofarmacêuticos, são indispensáveis na medicina

moderna. Apresentam valor de mercado estimado em 70 a 80 bilhões de dólares e taxas de crescimento anuais entre 7% e 15%, levando a um foco mundial no desenvolvimento e produção industrial destes medicamentos (VOGL et al., 2013).

Eles têm sido a principal força motriz para o crescimento da indústria farmacêutica nos últimos anos. De acordo com Ottens (2014), mais de 40% dos medicamentos aprovados pelo US Food and Drug Administration (FDA) em 2012 foram biofármacos, dos quais as proteínas terapêuticas, incluindo anticorpos monoclonais (mAbs), constituíram o maior grupo seguidos dos peptídeos terapêuticos.

O desenvolvimento destes medicamentos criou opções de tratamento para algumas das doenças mais frequentes e complexas, tais como a esclerose múltipla, a doença de Alzheimer, tumores cerebrais, leucemia linfocítica crônica, e o câncer, entre muitas outras (MADEIRA et al., 2012).

Atualmente, representam 20% do mercado total farmacêutico e as expectativas sugerem que, na década atual, mais de 50% das novas drogas aprovadas serão biológicas (SANDRA et al., 2014).

1.2 Biomedicamentos: Breve Histórico, conceitos e aspectos gerais

A fabricação de produtos biotecnológicos pela indústria farmacêutica é percebida desde o final do século XIX, quando houve produção inicial de soros

hiperimunes, elaborados a partir da inoculação de toxinas bacterianas em cavalos, e vacinas preparadas pela inativação de microorganismos. No início do século XX, descreveu-se o primeiro tratamento de sucesso para pacientes diabéticos utilizando insulina de origem animal (WALSH, 2003).

Entretanto, conforme Rang et al. (2012), existiam dificuldades na extração destas substâncias e baixos rendimentos. Além disso, a administração de hormônios animais aos seres humanos podia provocar respostas imunológicas, havendo ainda o perigo de transmissão de agentes infecciosos.

O surgimento das técnicas de engenharia genética proporcionou um novo meio de lidar com esses problemas. Em 1980, o FDA aprovou o uso clínico da insulina recombinante humana obtida a partir de *Escherichia coli*, tornando-se a primeira proteína recombinante farmacêutica a entrar no mercado (Weinacker et al., 2013). De acordo com Ferro (2010), isto possibilitou a redução significativa de transtornos relacionados à impureza do hormônio, o qual era obtido inicialmente por purificação a partir do pâncreas de animais. Este foi um marco inicial para a pesquisa e o desenvolvimento de muitos outros produtos biofarmacêuticos nos anos seguintes.

O conceito de biofármacos na década de 80 faz menção a uma classe de produtos terapêuticos produzidos através de técnicas de biotecnologia, ou seja, por tecnologia de DNA recombinante ou de hibridomas.

Desta forma, refere-se a proteínas ou produtos à base de ácido nucleico utilizados para fins terapêuticos ou de diagnóstico *in vivo*, produzidos por processos que não envolvem a extração direta a partir de uma fonte biológica (WALSH, 2003).

No Brasil, são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como: “medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal ou medicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos” (Brasil, 2010).

1.3 Regulamentação de Biomedicamentos

O processo de desenvolvimento de um fármaco, seja de um produto farmacêutico (moléculas pequenas) ou biofarmacêutico (grande biopolímero, normalmente uma proteína) é complexo, pois sua comercialização envolve riscos e perigos aos pacientes. A fim de minimizá-los, as indústrias farmacêuticas e biofarmacêutica são altamente regulamentadas e controladas pelas agências reguladoras governamentais (HOUD; BERKOWITZ, 2015).

De acordo com Metz et al. (2002), é necessário garantir o mínimo, porém alto padrão de qualidade dos produtos biológicos, internacionalmente estabelecidos. Para tal, a atuação das Agências Regulatórias como a ANVISA é imperativa.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N°55 da ANVISA (2010) que “dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá

outras providências”, estabelece os requisitos mínimos para o registro destes medicamentos no Brasil, os quais incluem os biofármacos, com o propósito de garantir sua qualidade, segurança e eficácia. De acordo com a norma, somente poderão ser comercializados e distribuídos no País aqueles produtos registrados na ANVISA, fabricados ou importados por estabelecimentos devidamente autorizados pelo Governo Federal e licenciados pelo governo Estadual.

Este registro pode se dar por duas vias: a via de desenvolvimento individual e a via de desenvolvimento por comparabilidade. A primeira requer a apresentação de dados totais sobre o desenvolvimento, produção, controle de qualidade e dados não-clínicos e clínicos para demonstração da qualidade, eficácia e segurança do produto, de acordo com o estabelecido na referida Resolução. Na segunda, utiliza-se o exercício de comparabilidade em termos de qualidade, eficácia e segurança, entre o produto desenvolvido a ser comparável e o “produto biológico comparador” (produto registrado na ANVISA, tendo sido embasado por um dossiê completo).

Dentre as informações que devem ser apresentadas pelas empresas solicitantes, incluem-se a descrição de todos os testes de controle de qualidade realizados, desde o princípio ativo até o produto terminado e o fornecimento de dados referentes à caracterização da substância ativa.

De acordo com Deeb et al., 2013, a mesma qualidade padronizada para moléculas menores deve ser seguida para biofármacos. A qualidade é garantida pela identificação inequívoca, rigoroso controle de pureza, e avaliação de isoformas, agregados, produtos de degradação e variantes conformacionais. Em seguida, ensaios precisos com o composto principal e indicadores de estabilidade fornecem a uniformidade de dosagem necessária.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo realizar uma análise, através de uma revisão bibliográfica sistemática, sobre as principais técnicas utilizadas na caracterização e controle de qualidade de biomedicamentos.

2. METODOLOGIA

Realizou-se Pesquisa Bibliográfica sistemática fundamentada na análise de literatura já publicada sobre o assunto na forma de livros, Farmacopéias, compêndios oficiais, legislação, bem como as disponibilizadas na internet, através dos bancos de dados Science Direct e Scientific Eletronic Library Online (SCIELO), a partir dos descritores indexados: *Biomedicamentos*, *Controle de qualidade*, *Caracterização*, cruzados entre si.

Como critérios de seleção, foram considerados os artigos publicados entre 2005 e 2015, disponíveis de forma completa, nos idiomas Inglês, Espanhol ou Português. A partir dessa busca, foi realizada leitura dos

resumos e aplicada, como critério de inclusão, a discussão de aspectos relevantes sobre o tema. Foram excluídos os artigos que não estavam relacionados ao objeto do estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização e Controle de Qualidade de Biomedicamentos

Os Biomedicamentos são produtos complexos que requerem rigoroso controle de qualidade para garantir sua segurança e eficácia. Durante o desenvolvimento dessas drogas, uma extensa caracterização de lotes do medicamento deve ser conduzida. Nenhum método analítico único, porém, é capaz de avaliar todos os atributos relevantes, de forma que uma bateria de técnicas físico-químicas e ensaios biológicos fornecendo informações complementares são necessários (Silva et al., 2008).

Conforme Guiochon&Beaver (2011), estes medicamentos apresentam elevado peso molecular e origem biológica complexa, além de composição molecular difícil de definir, uma vez que são derivados de misturas heterogêneas feitas a partir dos produtos de organismos vivos, células, animais ou plantas. A maior parte é produzida por engenharia genética em vez de uma série de reações químicas conhecidas e controladas, de forma que o desenvolvimento e a produção destes produtos requerem inovação científica, habilidades de

produção, amplo conhecimento interdisciplinar e um grande investimento, sendo indispensável o entendimento de técnicas de purificação.

A caracterização adequada de biofármacos é uma tarefa analítica árdua. Entre os testes envolvidos, estão: a determinação da sequência exata de aminoácidos, das truncagens e dobragens, do número de ligações dissulfeto entre os aminoácidos estruturais, do número de fosforilações e dos diferentes grupos laterais de açúcar. Ademais, incluem-se os testes para caracterizar a natureza e grau de agregação, se a proteína foi modificada após a sua síntese inicial e a caracterização do seu grau de estabilidade. Por fim, é necessário entender sua ligação ao alvo terapêutico, a seletividade desta interação e se há possibilidade de a mesma ocorrer em outros alvos, de forma a causar efeitos adversos (GUIOCHON; BEAVER, 2011).

No Brasil, a RDC N°55 da ANVISA (2010) estabelece que o registro de produtos biológicos requer a apresentação de relatório técnico contendo as seguintes informações sobre o controle de qualidade destes medicamentos:

- a. Descrição de todos os testes de controle de qualidade realizados, desde o princípio ativo até o produto terminado;
- b. descrição dos padrões de referência utilizados;
- c. validação de metodologias analíticas de acordo com a legislação sanitária vigente; e

d. referência e justificativa para cada especificação determinada nos testes de controle de qualidade.

Ainda de acordo com esta Resolução, devem ser fornecidos dados referentes à caracterização da substância ativa, sendo obrigatória a apresentação de:

- a. estrutura primária, indicando os sítios de modificações pós-traducionais;
- b. estruturas secundária, terciária e quaternária;
- c. massa molecular relativa;
- d. comparação entre a molécula produzida e a molécula original;
- e. caracterização das formas resultantes de modificações pós-traducionais;
- f. descrição e justificativa para modificações realizadas na molécula pós-cultivo, quando aplicável;
- g. determinação da atividade biológica;
- h. determinação do grau de pureza;
- i. dados sobre agregados; e
- j. determinação das propriedades físico-químicas e imunoquímicas;

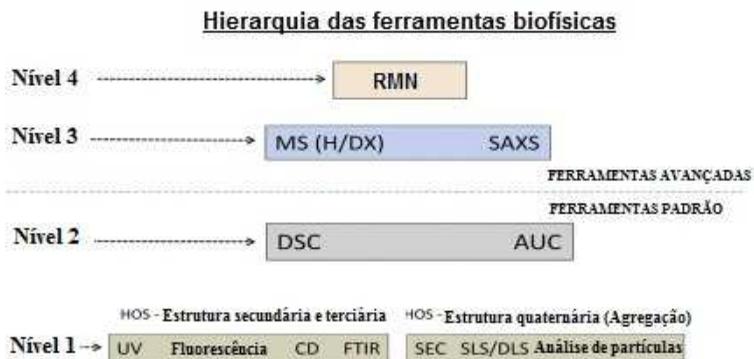
Dado o número de produtos biofarmacêuticos comercialmente disponíveis no ano de 2014 tendo como princípio ativo uma proteína, a palavra "biomedicamento" tem sido praticamente equivalente a

“fármaco proteico”, que o FDA definiu em 2012 como qualquer cadeia de polipeptídeo com mais de 40 aminoácidos. Embora outras classes químicas de produtos biofarmacêuticos existam, onde o princípio ativo não é uma proteína, a contribuição destes para o cenário comercial da indústria biofarmacêutica é atualmente muito pequena (HOUDE; BERKOWITZ, 2015). Assim, as principais técnicas utilizadas para análise destes medicamentos têm como foco a caracterização de proteínas, sendo descritas a seguir.

3.2 Principais técnicas analíticas para biomedicamentos

Houde&Berkowitz (2015) categorizaram as ferramentas biofísicas específicas para análise de biomedicamentos em quatro níveis diferentes com base no conteúdo informativo que elas podem fornecer, conforme figura 1. Segundo esta classificação, as ferramentas de nível 1 fornecem o menor grau de informação, enquanto aquelas de nível 4, o mais alto grau. Ao mover-se em direção ao nível 4, os atributos dos métodos em cada camada subsequente tornam-se mais difíceis de usar e operar, são mais caros, requerem mais tempo para adquirir os dados e mais treinamento ou experiência para processar, analisar e interpretá-los.

Figura 1 - Hierarquia das ferramentas biofísicas para análise de biomedicamentos.



Fonte: Houde; Berkowitz, 2015, p. 80. (Adaptada)

As ferramentas dos níveis 1 e 2 formam o grupo de “ferramentas biofísicas padrão”, sendo as mais aplicáveis e utilizadas por muitas empresas biofarmacêuticas na caracterização e desenvolvimento de seus produtos, de forma que os métodos gerados a partir delas são encontrados em praticamente todos os arquivamentos regulatórios. No nível 1 tem-se os métodos espectroscópicos: Ultravioleta (UV), fluorescência, dicroísmo circular (CD), e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); e um conjunto separado de ferramentas biofísicas que fornecem informações básicas sobre a estrutura quaternária, em termos de agregação dos biofármacos: Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), espalhamento de luz estático / dinâmico (SLS / DLS) e análise de partículas. O nível 2 é representado por: Ultracentrifugação analítica (AUC) e calorimetria de

varrimento diferencial (DSC). Já o segundo grupamento, formado pelos níveis 3 e 4, constitui as “ferramentas biofísicas mais avançadas” com capacidade de gerar informações com maior detalhe e resolução, melhorando a caracterização desses fármacos. O nível 3 é representado pela espectroscopia de massa (MS) e pelo pequeno ângulo de espalhamento de raios X (SAXS), enquanto o nível 4 pela Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A seguir serão discutidas algumas das principais ferramentas biofísicas utilizadas para controle de qualidade de biofármacos e sua caracterização, com explanação dos métodos que fundamentam sua análise.

3.2.1 Métodos Termodinâmicos

Nesta abordagem, a estrutura do biofármaco é examinada através do estudo do fluxo de calor quando uma proteína é exposta a um aumento contínuo de temperatura. Parte-se do princípio de que a expansão de uma macromolécula com o aumento da temperatura reflete o seu empacotamento atômico e flexibilidade. Assim, a energia liberada ou absorvida em função do aumento da temperatura, proporciona impressão digital única da estrutura deste medicamento (HOUDE & BERKOWITZ, 2015).

3.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

É uma técnica térmica na qual as diferenças no fluxo de calor na substância e referência são medidas em função da temperatura da amostra enquanto as duas estão

submetidas a um programa de temperatura controlada. Este método mede as diferenças em energia e tem encontrado larga aplicação na indústria farmacêutica para teste de pureza de amostras de fármacos (SKOOG et al., 2006).

3.2.3 Métodos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de uma mistura, efetuada por meio da distribuição destes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma dessas fases conserva-se estacionária, enquanto a outra se move através dela, de forma que cada componente da mistura é seletivamente retido pela primeira, resultando em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS et al., 2006).

Os métodos cromatográficos têm vasta utilização na análise de proteínas, sendo empregados tanto na avaliação de sua homogeneidade, como em ensaios de caracterização e quantificação (ANDRADE, 2007).

A diversidade físico-química de proteínas (carga, ponto isoelétrico, hidrofobicidade, tamanho), possibilita sua separação por quase todos os métodos de separação baseados em líquido. Diferentes seletividades são oferecidas pela cromatografia líquida de fase reversa, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de interação hidrofílica, cromatografia de exclusão de tamanho e a cromatografia de troca iônica. Todos eles têm características únicas para separação de proteínas e, no final, fornecem informações complementares (SANDRA et al., 2014).

3.2.4 Métodos eletroforéticos

A eletroforese é um método de separação baseada na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em uma solução tampão através da qual tenha sido aplicado um campo elétrico de corrente contínua. Uma característica particular é a sua habilidade única de separar macromoléculas carregadas de interesse da indústria biotecnológica e de pesquisas em biologia e bioquímica (SKOOG et al., 2006).

3.2.4.1 Eletroforese capilar

Este tipo de eletroforese utiliza tubos capilares preenchidos com tampão, com tipicamente 10 a 100 μ m de diâmetro interno e 40 a 100 cm de comprimento. A amostra é introduzida na extremidade do tubo e um potencial de corrente contínua de 20 a 30 kV é aplicado entre os dois eletrodos durante a separação. O fluxo eletroosmótico da solução tampão atua como uma bomba para mover as moléculas do analito através de uma segunda fase capaz de retenção variada das moléculas (SKOOG et al., 2002).

Conforme Andrade (2007), a mobilidade eletroforética de uma proteína é dependente das características do soluto, como tamanho molecular, carga elétrica e forma, bem como das características do tampão onde acontece a migração (pH, tipo e força iônica do eletrólito, viscosidade e aditivos).

As principais aplicações desta técnica compreendem separações quirais, análise de

biomoléculas, incluindo produtos biotecnológicos e amostras clínicas, sendo especialmente adequada para as análises de misturas complexas (DEEB et al., 2013).

Dentre as principais características, apresenta alta eficiência de separação (Normalmente acima de 10^5 pratos teóricos), baixo consumo de amostras (nL) e reagentes (mL), tempos de análise reduzidos e alto grau de automação (SILVA, 2003).

Muitas vezes, é vantajoso combinar EC com MS (EC-MS) para uma análise ainda mais potente de biofármacos ou de produtos farmacêuticos em fluidos biológicos. O acoplamento combina a alta eficiência de separação da EC que ajuda a evitar ou a minimizar a co-migração de compostos ou interferências com matrizes, e a detecção massa-seletiva que proporciona acurada caracterização e identificação dos analitos. Em comparação com LC-MS, EC-MS proporciona vantagens na análise de compostos altamente polares e carregados, particularmente proteínas intactas. Além disso, a CE-MS muitas vezes pode oferecer tempos de análise mais curtos e melhor eficiência de separação (DEEB et al., 2013).

3.2.4.2 Focalização isoeétrica capilar

É utilizada para separar espécies anfipróticas, como aminoácidos e proteínas, que contêm um grupo carboxílico fraco e um grupo amino que é uma base fraca. A separação é realizada em uma mistura tamponada que varia continuamente o pH ao longo do seu comprimento. Este gradiente de pH é preparado a

partir de uma mistura de vários anfólitos diferentes na solução aquosa (SKOOG et al., 2002).

3.2.4.3 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE) é utilizada para separar proteínas pelo seu peso molecular, permitindo que as mesmas migrem por tamanho através da utilização do dodecil sulfato de sódio (SDS) e de um agente redutor. O SDS é um detergente aniônico que desnatura proteínas por envolver o esqueleto polipeptídico formando uma micela, e assim confere uma carga negativa líquida na proporção do seu comprimento, além disso, também perturba a maioria das ligações não covalentes, diminuindo assim o dobramento das proteínas. Um agente redutor tal como β -mercaptoetanol ou ditioneitol é adicionado para reduzir as ligações de cistina (pontes dissulfeto) e promover ainda mais desdobramento. Após aquecer uma amostra proteica em SDS e β -mercaptoetanol, todas as proteínas agem como moléculas carregadas negativamente lineares e podem ser eletroforicamente separadas por tamanho. Depois desta separação no gel, tanto ele pode ser manchado não especificamente para visualizar as bandas de proteína utilizando azul de Coomassie, GelCode azul, ou Silver Stain; ou as proteínas podem ser transferidas para uma membrana de nitrocelulose para imunoblotting (Western blotting) a fim de se visualizar uma proteína específica de interesse (CARSON et al., 2012).

Esta é a técnica de eletroforese mais utilizada para avaliar a qualidade farmacêutica dos produtos protéicos, tendo seu uso na caracterização qualitativa das proteínas contidas em preparações biológicas, nos controles de pureza e em determinações quantitativas. A análise por eletroforese em gel é um processo adaptado à identificação e ao controle da homogeneidade das proteínas presentes em preparações farmacêuticas, sendo utilizada como rotina para avaliar a massa molecular das subunidades protéicas e determinar as subunidades que compõem as proteínas purificadas (Farmacopeia brasileira, 2010).

3.2.5 Métodos espectroscópicos

A espectroscopia engloba um grupo de métodos biofísicos que se baseiam na absorvência inicial de radiação eletromagnética por grupamentos estruturais específicos de elementos químicos ou átomos numa molécula, chamados cromóforos. Das características distintivas entre cada um destes métodos, a propriedade sobre a faixa limitada de comprimentos de onda da radiação eletromagnética que podem utilizar é o mais importante. Dada essa singularidade, cada um examina apenas certos cromóforos na droga protéica. Em geral, estas interações prosseguem pela absorção inicial de alguma proporção da radiação eletromagnética incidente; no entanto, em algumas formas de espectroscopia (fluorescência), esta radiação absorvida pode ser reemitida em diferentes comprimentos de onda. Embora a espectroscopia seja um campo diversificado e inclua muitos métodos, como a ressonância magnética nuclear,

espectrometria de massa, ultravioleta, espectroscopia de fluorescência, decroísmo circular e espectroscopia de infravermelho, aqueles que fazem medições no Ultravioleta (UV), visível (VIS), infravermelho e região de ondas de radio são geralmente de maior interesse para os cientistas biofarmacêuticos (HOUDE; BERKOWITZ, 2015).

4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível concluir que a tendência de crescimento cada vez maior do mercado mundial de biofármacos nos últimos anos tem demandado por métodos adequados de controle de qualidade e caracterização que possam garantir a segurança e eficácia desses medicamentos. Isto, por sua vez, constitui um grande desafio levando em consideração a complexidade desses produtos.

Várias técnicas têm sido sugeridas para tal finalidade envolvendo diferentes fundamentos biofísicos com ampla gama de aplicações. A capacidade de encontrar uma ferramenta biofísica única que forneça todas as informações referentes às estruturas proteicas biofarmacêuticas não é atualmente prática, de forma que, o uso coletivo e complementar é o meio mais apropriado para desenvolver uma impressão digital suficientemente elucidativa. Ademais, todas essas ferramentas possuem limitações que podem variar de um biomedicamento para outro.

É imprescindível, portanto, assegurar que a escolha dos métodos analíticos em questão seja meticulosa e fundamentada, bem como amparada pelos atos regulatórios do país. No Brasil, percebe-se que as legislações em vigor relacionadas a biomedicamentos e compêndios oficiais, a despeito dos critérios para controle de qualidade e caracterização estabelecidos, carecem de especificações mais direcionadas no que se refere à seleção dessas ferramentas.

Apesar do amplo espectro de diferentes metodologias disponíveis para elucidação estrutural dos biomedicamentos, ainda há lacunas de conhecimento significativas diante da complexidade dessas moléculas. Portanto, a busca por avanços nesta área devem continuar no intuito de possibilitar melhor caracterização destes fármacos que têm revolucionado mundialmente a prática farmacoterapêutica nos dias atuais.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 94 – 147 p.

BRASIL. RDC N°- 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

CARSON, S.; MILLER, H. B.; WITHEROW, D. S. Expression of Fusion Protein from Positive Clones, SDS-

PAGE and Western Blot: Part 1. **Molecular Biology Techniques**. Academic Press, 2012. P. 89-97.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP. 2006.

DEEB, S. E.; WATZIG, H.; EL-HADY, D. A.; Capillary electrophoresis to investigate biopharmaceuticals and pharmaceutically-relevant binding properties. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 48, p.112-131, 2013.

FERRO, E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 109-121, 2010.

GUIOCHON, G.; BEAVER, L.A. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8836– 8858, 2011.

HOUDE, D. J.; BERKOWITZ, S. A. Biopharmaceutical Industry's Biophysical Toolbox. In: Houde, D. J.; Berkowitz, S. A. (Eds). **Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals**. Oxford:Elsevier Science Ltd, 2015. P. 49-78.

Houde, D. J.; Berkowitz, S. A. (Eds). Organization of the Biophysical Tool in Section II. In: Houde, D. J.; Berkowitz, S. A. (Eds). **Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals**. Oxford:Elsevier Science Ltd, 2015. P. 79-85.

MADEIRA, L. S.; BORSCHIVER, S.; PEREIRA JR, N. Prospects and Trends in the Brazilian Market for Biologically Sourced Products. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 7, n. 3, P. 44-56, 2012.

METZ, B.; HENDRIKSEN, C. F. M.; Jiskoot, W., Kersten G. F. A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, n. 19-20, p. 2411-2430, 2002.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**.7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

SANDRA, K.; VANDENHEEDE, I.; SANDRA, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 81–103, 2014.

SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003.

SILVA, M. M.C.G. et al. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. **Biologicals**, v. 36, n. 6, p. 383-392, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre : Bookman, 2002. reimpressão, 2006.

VOGL, T.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 1094–1101, 2013.

WALSH, Gary. **Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnonology**. 2 ed. England, Wiley, 2003. 551 p.

WEINACKER, D. et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1043-1048, 2013.

CAPÍTULO III

MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOMEDICAMENTOS PRODUZIDOS EM INSTITUIÇÕES PÚBLICAS DO BRASIL

Ana Claudia Carvalho¹

César Augusto Souza de Andrade²

Marina Galdino da Rocha Pitta²

Maria Danielly Lima Oliveira²

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Departamento de Bioquímica, UFPE

E-mail de contato:ana_claudiacarvalho@yahoo.com.br

RESUMO - *O Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica consiste de um conjunto de operações a fim de assegurar a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis. Biomedicamentos são obtidos a partir fluidos biológicos e/ou tecidos de origem animal e foram desenvolvidos com propósito terapêutico.No Brasil a única instituição pública que produz biomedicamentos é*

a FIOCRUZ, que além de produzir antibióticos, anti-inflamatórios e analgésicos produz os biomedicamentos Alfainterferona 2b, a Alfaepoetina e a Alfataliglicerase. A alfainterferona 2b é um interferon que tem efeitos antiviral, antiproliferativo e imunomodulador. A Alfaepoetina é um hormônio glicoprotéico que é responsável pela mitose e formação das hemácias. Desta forma, esta revisão teve como objetivo definir possíveis métodos imunquímicos para controle de qualidade de biomedicamentos produzidos por instituições públicas no Brasil que possam ser incorporados a farmacopeia brasileira. A metodologia utilizada foi a de análise de literatura já publicada.

Palavras chave: Proteínas recombinantes; Imunoensaios; Produtos biofarmacêuticos.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) medicamentos biológicos ou biomedicamentos são constituídos por moléculas complexas e com alto peso molecular e que são obtidas a partir fluídos biológicos e/ou tecidos de origem animal, onde células vivas, tecidos e órgãos são utilizados para produção destes medicamentos (ANVISA, 2014).

Os biomedicamentos foram desenvolvidos com propósito terapêutico, principalmente para doenças onde não há resposta a tratamentos convencionais (CORNETTA, 2013). Os métodos de análise

imunoquímicas foram primeiramente desenvolvidos para análise de macromoléculas, tais como enzimas e hormônios, sendo posteriormente utilizados para análise de drogas e fármacos (NUNES, 2005). As técnicas de imunoquímica utilizam anticorpos específicos para o reconhecimento da molécula de interesse presente no material analisado, no entanto é necessário um conhecimento prévio do material analisado. Os ensaios Imunoquímicos são altamente seletivos, sensíveis e de fácil utilização, uma vez que é possível a análise de várias amostras de uma só vez.

São inúmeras as vantagens obtidas com a utilização dos métodos imunoquímicos, tais como estratégias utilizadas para a garantia da qualidade dos procedimentos operacionais; análise dos dados e das informações lançadas em forma de relatórios técnicos; e controle de qualidade para a melhoria da confiabilidade dos métodos, incluindo os ensaios para validação. Existem, ainda, algumas dúvidas quanto aos testes mínimos necessários para a demonstração de atributos de qualidade, segurança e eficácia, sendo os ensaios imunológicos uma opção confiável para ser utilizada no controle de qualidade dos produtos biológicos, principalmente os biomedicamentos, uma vez que possuem alta sensibilidade, seletividade e permite análise de várias amostras aos mesmo tempo. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi analisar através de revisão bibliográfica possíveis métodos imunoquímicos para controle de qualidade de biomedicamentos produzidos por instituições públicas no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a obtenção dos dados foi obtida através de pesquisa bibliográfica, através da análise de literatura já publicada, na forma de livros, farmacopéias, compêndios oficiais, disponibilizadas na Internet e através de banco de dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil a única instituição pública que produz biomedicamentos é a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), vinculada ao Ministério da Saúde. A FIOCRUZ produz desde antibióticos, anti-inflamatórios e analgésicos a biomedicamentos. Os medicamentos biológicos produzidos por ela são a Alfaferona 2b, a Alfaferona e a Alfaferonase (FioCruz, 2015). Os medicamentos biológicos de última geração são obtidos pelo emprego industrial de microrganismos ou pela tecnologia do DNA recombinante, crescidas em reatores, para a produção de determinadas proteínas que são idênticas ou muito parecidas com as proteínas humanas.

A qualidade do produto biológico no mercado farmacêutico brasileiro é regularmente avaliada mediante a realização de ensaios laboratoriais executados na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas) e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS), da FIOCRUZ.

Diferentemente da maioria dos medicamentos, o controle de qualidade das proteínas recombinantes é muito complexo, pois requer a combinação de metodologias de natureza físico-química, imunológica e biológica, para a completa identificação, caracterização química e avaliação da potência biológica (Gilg et al., 1996).

O apoio ao uso das metodologias imunoquímicas tem sido baseado em três pontos: i) alta sensibilidade alcançada por muitos imunoenaios; ii) elevada especificidade, que torna os imunoenaios capazes de detectar, com exatidão, um determinado contaminante, e iii) extrema simplicidade operacional, com possibilidade de se analisar, de uma só vez, inúmeras amostras.

Existem vários tipos ou formatos de imunoenaios e um deles é o Enzyme-Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA). Por apresentarem alta seletividade e sensibilidade, os testes ELISA, são baseados na reação entre antígeno e anticorpo, sendo uma de suas vantagens a realização de testes *in situ* de um grande número de amostras simultâneas. Já a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, nos últimos anos passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (Degani et al., 1998). A cromatografia de imunoafinidade é baseada no reconhecimento de epítos antigênicos por anticorpos. As colunas cromatógraficas contêm anticorpos seletivos que podem ser monoclonais ou policlonais e são

considerados como reagentes ou como grupos funcionais ligados a um suporte sólido.

4. CONCLUSÃO

Dentre os ensaios preconizados nos compêndios oficiais e realizados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS) para o controle da qualidade estão análise de protocolo resumido de produção e controle, avaliação da potênciabiológica, determinação de pH, volume médio, identificação por western blotting, identificação por SDS-PAGE, esterilidade, e endotoxina bacteriana, não havendo análise através do ELISA e da Cromatografia por Imunoafinidade.

Na utilização do ELISA para realizar o controle de qualidade dos biofármacos tem-se como vantagem sua alta sensibilidade e especificidade, bem como há possibilidade de análise de um grande número de amostra ao mesmo tempo, sendo muito vantajosa para controle de qualidade de biomedicamentos em larga escala. Já na utilização de colunas cromatográficas de imunoafinidade temos como vantagens a especificidade do método, rapidez na análise e baixo consumo de solventes. No entanto, este método exige a utilização de reagentes com alto grau de pureza, equipamento/manutenção de alto custo e supervisão por técnicos especializados, restringindo o emprego na rotina laboratorial.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA. Assuntos de Interesse / Produtos biológicos. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Produtos Biológicos](http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Produtos+Biologicos). Acesso em: 05 de dezembro de 2014.

CORNETTA, K. Biomedicines - Moving Biologic Agents into Approved Treatment Options. *Biomedicines*, v. 1(1), p. 1-2, 2013.

DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. V. Cromatografia, um breve ensaio. *Cromatografia*, n. 7, 1998.

FIOCRUZ. Biomedicamentos. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/biomedicamentos> Acesso em: 14 de Agosto de 2015.

GILG, D., RIEDL, B., ZIER, A., ZIMMERMANN, M. F. Analytical methods for characterization and quality control of Pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an exemple. *Pharmac. Acta Helvetiae*, v 71(6),p. 383-394, 1996.

NUNES, G. S. Métodos Imunoquímicos para Análise de Contaminantes Ambientais: Conceitos, Estado da Arte e Perspectivas. *Quim. Nova*, v. 28(3), p. 462-471, 2005.

CAPÍTULO IV

PLANOS DE AMOSTRAGEM NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Bárbara Kerolen Silva¹

Breno Caldas de Araújo²

Mônica Felts de La Roca Soares³

¹ UniNovarstis/UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

² Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³ Departamento de Farmácia – UFPE.

E-mail de contato: b.kerolen@hotmail.com

RESUMO – *A definição de uma técnica de amostragem é um passo crítico e importante para assegurar a qualidade do produto final. As técnicas tradicionais se mostram confiáveis, mas são bastante invasivas para esse setor da indústria. Qualidade por design oferece vantagens em relação aos modelos conservadores de garantia de qualidade, sendo útil em áreas onde a qualidade é significado de diferenciação e*

implementação de processos flexíveis para estimular a melhoria contínua e inovação dos processos.

Palavras chave: Amostragem, produtos biotecnológicos, qualidade por meio de testes, qualidade por design.

1. INTRODUÇÃO

A Qualidade é sinônimo de lucratividade, desde que bem aplicada e bem utilizada dentro do ambiente industrial e a adoção de adequadas práticas de gestão da qualidade, normalização, metrologia e avaliação da conformidade, representam um diferencial na economia globalizada. (CABRAL et al., 2014).

A maioria das ferramentas de qualidade se apoiam fortemente na coleta de dados e informações para a devida tratativa dos problemas e melhorias de processo. Nesse sentido, estudos estatísticos vem ganhando espaço dentro das organizações por oferecer recursos poderosos para interpretações analíticas.

Inicialmente, deve ser definido qual ou quais as características dos elementos que deverão ser verificados, pois não se trabalham estatisticamente com os elementos existentes, mas com características dos mesmos, ou seja, com os valores de uma variável ou característica de interesse. Esta escolha dependerá dos objetivos do estudo, podendo esta variável ser qualitativa, quando resultar de uma classificação por tipos ou atributos, ou

quantitativa, quando seus valores forem expressos em números (CABRAL et al., 2014).

Para a indústria farmacêutica, a qualidade do produto final tem compreensão bastante abrangente. Ela inclui: os objetivos terapêuticos destinados; população de pacientes; via de administração; características farmacocinéticas de insumo farmacêutico ativo (IFA); as características químicas, físicas e biofarmacêutica do insumo farmacêutico ativo; a garantia de processos de fabricação utilizando princípios de engenharia, ciência dos materiais que proporcionem um produto aceitável e reprodutível e que mantenha seu desempenho durante toda a vida útil (GARCÍA APONTE et al., 2015).

A escolha das amostras pode ser realizada de diferentes maneiras. Sendo assim, é importante compreender quais são as situações adequadas para o uso das técnicas de amostragem probabilística e não probabilística, e quais são as limitações do uso de cada uma dessas técnicas (OLIVEIRA, K. D.; ALMEIDA, K. L.; BARBOSA, 2012).

O objetivo desse trabalho é orientar de forma prática sobre os tipos de amostragem estatísticas e como elas influenciam no controle de qualidade de produtos e quais as vantagens associadas a cada técnica e a frequência com que elas são aplicadas.

2. REFERENCIAIS TEÓRICOS

2.1 Ferramentas da qualidade

A tratativa dos dados coletados a partir das amostras, geralmente, é realizada por meio de ferramentas estatísticas que permitem um estudo sistemático e abrangente. Nos próximos tópicos, serão apresentadas as principais ferramentas da qualidade, sua aplicação, vantagens e desvantagens (ANVISA, 2010).

2.1.1 Qualidade

A questão moderna da qualidade de bens e serviços está vinculada à satisfação e proteção do consumidor. No Brasil, a ANVISA tem o papel institucional de promover e proteger a saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, incluindo os fármacos e cosméticos (ANVISA, 2010).

2.1.2 Controle de processo

O Controle de Qualidade é o conjunto de atividades destinadas a verificar e assegurar que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que o produto não seja disponibilizado para uso e venda até que cumpra com a qualidade preestabelecida. O Controle de Qualidade não deve se limitar às operações laboratoriais, mas abranger todas as decisões relacionadas à qualidade do produto e o controle dos processos envolvidos (GARCÍA APONTE et al., 2015).

Nesse contexto se insere o controle estatístico de processos, que possui poderosa coleção de ferramentas de resolução de problemas útil na obtenção da estabilidade do processo e na melhoria da capacidade através da redução da variabilidade. Na tabela 1, podemos verificar as principais ferramentas da qualidade, suas formas de utilização, vantagens e desvantagens (MONTGOMERY, 2009).

Tabela 1 - Ferramentas da qualidade, formas de utilização, vantagens e desvantagens.

Ferramenta	O que são?	Como usar?	Vantagens	Desvantagens
Folha de verificação	São formulários planejados nos quais os dados coletados são preenchidos de forma fácil e concisa. Registram os dados dos itens a serem verificados, permitindo uma rápida percepção da realidade e uma imediata interpretação da situação, ajudando a diminuir erros.	São usadas para: tornar os dados fáceis de obter e de utilizar-se, dispondo-os de forma organizada e permitindo identificação de itens defeituosos, tipos de defeitos, período de ocorrência dos principais desvios de qualidade.	Identificação dos desvios no momento da ocorrência.	O processo de coleta pode ser lento pois depende da amplitude da amostra.
Diagrama de Pareto	Diagrama que apresenta os itens e a classe na ordem dos números de ocorrências, apresentando a soma total acumulada, disposto em forma de barra, é uma ferramenta eficiente para encontrar problemas, que permite focalizar esforços nos problemas que tem maior potencial de retorno	Para identificar os problemas de maiores impactos, priorizar e esforçar/investimentos, estratificar problemas.	Visualização dos diversos elementos de um problema, ajudando a classificá-los e priorizá-los	Tendência em se deixar os "20% triviais" em segundo plano. Isso gera a possibilidade de Qualidade 80% e não 100%; requer medição confiável e detalhada dos dados.

Ferramenta	O que são?	Como usar?	Vantagens	Desvantagens
Diagrama Causa e efeito	É uma representação gráfica que permite a organização das informações possibilitando a identificação das possíveis causas de um determinado problema ou efeito. Também chamado de diagrama de espinha de peixe ou diagrama de Ishikawa.	Identificar todas as causas possíveis de um problema, subdividindo-as em sub-causas, sobre um efeito ou resultado.	Ferramenta estruturada, que direciona os itens a serem verificados para que se chegue a identificação das causas de determinado problema/desvio.	Não apresenta quadro evolutivo como é o caso do histograma, de modo que, para cada nova situação, é necessário percorrer todos os passos do processo, utilizando o diagrama.
Histogramas	São gráficos de barras que mostram a variação sobre uma faixa específica, descrevendo a frequência com que variam os processos e a forma de distribuição dos dados como um todo	Verificar o número de produto não-conforme e determinar a dispersão dos valores de medidas em peças. • Em processos que necessitam ações corretivas.	Visão rápida de análise comparativa de uma sequência de dados históricos	Pouco representativo se necessita a comparação de muitas sequências ao mesmo tempo
Gráficos de controle	São gráficos para examinar se o processo está ou não sob controle ao longo do tempo, mostra a distribuição dos dados em um gráfico de dispersão que possui limites calculados de acordo com a média da população.	Verificar se o processo está sob controle (dentro dos limites preestabelecidos) e controlar a variabilidade do processo, ou grau de não conformidade, decidindo sobre atuar ou não nas variáveis.	Mostram tendência, ao longo do tempo, permitindo avaliar a necessidade ou não de intervenção no processo.	Necessita de atualização constante e sistemática, sendo mais aplicado para casos onde a obtenção de dados é online.

Ferramenta	O que são?	Como usar?	Vantagens	Desvantagens
Fluxogramas	Resumo ilustrativo do fluxo das várias operações de um processo. Este documenta um processo, mostrando todas as suas etapas e facilitando a identificação das variáveis que influenciam no mesmo.	Identificar o fluxo atual do processo, as oportunidades de mudanças e variáveis. Visualizar globalmente das etapas de um processo.	Suporta muito bem a análise de processos, facilita a visualização de variáveis e melhorias.	Precisa ser desenvolvido em equipe e requer conhecimento aprofundado sobre as etapas do processo.

Adaptado de MONTGOMERY, 2009.

3. CONSIDERAÇÕES SOBRE AMOSTRAGEM EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

3.1 Controle de qualidade

Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o controle de qualidade é responsável pelas atividades referentes à amostragem, às especificações e aos ensaios, bem como à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação que garantam que os ensaios sejam executados e que os materiais e os produtos terminados não sejam aprovados até que a sua qualidade tenha sido julgada satisfatória.

As exigências básicas para o controle de qualidade incluem instalações adequadas, pessoal treinado, procedimentos aprovados – que devem estar disponíveis para amostragem -, inspeção e análise de matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermediários granel e terminados. Quando necessário, devem existir procedimentos aprovados para o monitoramento ambiental; amostras de matérias-primas, materiais de embalagem, produtos intermediários granel e terminados devem ser coletadas por meio de procedimentos aprovados e por pessoal qualificado pelo Controle de Qualidade; devem ser realizadas qualificações e validações necessárias relacionadas ao controle de qualidade; devem ser feitos registros (manual ou por meio eletrônico) demonstrando que todos os procedimentos de amostragem, inspeção e testes foram de fato realizados e que quaisquer desvios foram

devidamente registrados e investigados; os produtos terminados devem possuir a composição qualitativa e quantitativa de acordo com o descrito no registro; os componentes devem ter a pureza exigida, devem estar em recipientes apropriados e devidamente rotulados; devem ser registrados os resultados das análises realizadas nos materiais e produtos intermediários, a granel e terminados; devem ser retidas amostras suficientes de matérias primas e produtos para permitir uma análise futura; o produto retido deve ser mantido em sua embalagem final, a menos que a embalagem seja excepcionalmente grande (ANVISA, 2010).

Para o controle de matérias-primas e produtos intermediários, a granel e terminados, todos os ensaios devem seguir procedimentos escritos e aprovados e os resultados devem ser verificados pelo responsável antes que os materiais ou produtos sejam liberados ou reprovados.

Há uma preocupação de que as amostras sejam representativas do lote do material do qual foram retiradas, segundo procedimentos escritos e aprovados. Para isso, a amostragem deve ser realizada de forma a evitar a ocorrência de contaminação ou outros efeitos adversos sobre a qualidade do produto amostrado (ANVISA, 2010).

Esse é um aspecto crítico, para o caso de materiais biológicos, mais especificamente, deve-se tomar o cuidado de evitar contaminações ou misturas do material que está sendo amostrado, todos os

equipamentos utilizados na amostragem e que entrarem em contato com os materiais devem estar limpos, os equipamentos utilizados na amostragem devem estar limpos e, se necessário, esterilizados e guardados separadamente dos demais equipamentos laboratoriais (ANVISA, 2010).

Os processos de produção de biológicos têm uma variabilidade intrínseca e, portanto, a natureza dos subprodutos não é constante. Por esta razão, na fabricação de produtos biológicos é ainda mais crítico o cumprimento das recomendações estabelecidas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF), durante todas as fases de produção incluindo as etapas de amostragem e coleta (ANVISA, 2010).

4.NOVAS TECNOLOGIAS PARA AMOSTRAGEM DO PRODUTO FINAL

Como é possível observar, a definição de uma técnica de amostragem como as descritas nos tópicos anteriores em um processo biotecnológico é bastante invasiva para esse setor da indústria. Sobretudo por todo o risco envolvido na contaminação do produto final e/ou falta de eficácia dos IFA por amostragens erradas e pouco significativas. Quando se fala em amostragem, com essas características, ao longo do processo de fabricação (*in line*), qualquer uma das técnicas, por mais eficaz que seja do ponto de vista estatístico, se torna extremamente invasiva podendo ser fonte de

contaminação e devido ao grau de especificidade, prejudicial ao próprio processo produtivo do medicamento (FDA, 2015; WU et al., 2011).

Isso tudo sem levar em consideração os custos associados aos ensaios destrutivos em busca de alcançar a qualidade do produto final.

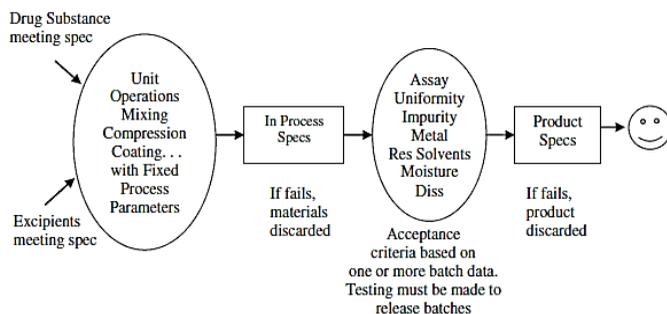
Fabricação farmacêutica convencional é geralmente realizada usando processamento em lotes com testes de laboratório realizados em amostras colhidas para avaliar a qualidade. Todos os lotes de produtos farmacêuticos terminados são testados e devem cumprir com as especificações aprovadas, caso contrário, são rejeitados. As análises da causa raiz por falha no cumprimento das especificações geralmente são pouco compreendidas e os fabricantes podem perder alguns lotes até as reais causas de falha serem compreendidas e solucionadas. Ou então a agência reguladora pode aceitar notificações de revisão dos critérios de aceitação (por exemplo, aprova estender a faixa da especificação) para a liberação dos lotes impedidos de comercialização. Tais especificações rigorosas podem resultar em recolhimentos de produto e falta de medicamentos no mercado.

Recursos significativos são desperdiçados debatendo-se problemas relacionados à aceitação da variação, necessidade de testes adicionais de controle, e estabelecimento de critérios de aceitação. Frequentemente estas discussões concentram-se nos limites de aceitação ou aspectos estatísticos.

4.1 Qualidade por meio de testes

A figura 1 mostra um diagrama simplificado de controle de qualidade sob a qualidade por meio de testes (QbT) quadro regulamentar para os medicamentos. Neste sistema, a qualidade do produto é assegurada por testes de matérias-primas, fabricação de drogas, um processo fixo de fabricação do medicamento, em ensaios de materiais e testes de produto final (YU, 2008).

Figura 1 - Diagrama de controle de qualidade simplificado usando QbT.



Fonte: Lawrence X. Yu. 2008

A qualidade de matérias-primas, incluindo substância medicamentosa e excipientes é monitorizado por meio de testes considerando as BPF e as normas vigentes.

Nessa estrutura, mais tradicional, a qualidade e desempenho do produto são, predominantemente, alcançadas através da restrição flexibilidade no processo

de fabricação e pelo teste final do produto. Há pouca ou nenhuma ênfase em como um desenho eficaz e eficiente de processo de fabricação pode garantir a qualidade do produto sem as intervenções de amostragem e os riscos/erros associados aos métodos de análises mais tradicionais (FDA, 2015).

4.2 Qualidade baseada no projeto

Como contraste a toda essa metodologia convencional tem-se a qualidade baseada no projeto do desenho, do inglês *Quality by design* (QbD). Apresenta-se com uma abordagem proativa, sistemática, científica, com base em análise de risco do desenvolvimento farmacêutico. Começa com objetivos pré-definidos e com destaque nas concepções do produto, do processo e do controle. Isto significa planejar e desenvolver formulações e processos de manufatura que garantam os objetivos pré-definidos da qualidade do produto através da identificação das características críticas de qualidade do ponto de vista do paciente, traduzindo-se em atributos que o produto deve apresentar independentemente das variações dos parâmetros críticos do processo. Para fazer isto as relações entre as variáveis da formulação e do processo produtivo (incluindo os atributos dos insumos ativos e dos excipientes, assim como os parâmetros do processo) e as características do produto são estabelecidas e as fontes de variação identificadas. O conhecimento assim adquirido é utilizado para implementar um robusto e flexível processo de manufatura que pode se ajustar e produzir um produto

consistente repetidamente. Os elementos QbD incluem as seguintes etapas (YU, 2008):

- Definir o perfil de qualidade do produto;
- Planejar e desenvolver o produto e o processo de manufatura;
- Identificar os atributos de qualidade, parâmetros do processo e fontes de variação;
- Controlar o processo de produção para atingir a qualidade definida de modo consistente.

Como é possível perceber, trata-se de uma sistemática baseada na garantia da qualidade através da compreensão completa da compatibilidade de um produto acabado com todos os componentes e processos envolvidos na sua fabricação. Em vez de confiar em testes de produtos acabados sozinho, QbD fornece insights a montante ao longo do processo de desenvolvimento. Como resultado, um problema de qualidade pode ser eficientemente analisado e sua causa raiz rapidamente identificado (WU et al., 2011).

QbD requer a identificação de todos os atributos de formulação e os parâmetros do processo críticos, bem como a determinação do impacto que uma variação possa ter na qualidade do produto acabado. Dessa maneira, QbD consegue estabelecer os parâmetros críticos do processo que devem ser acompanhados para produzir de forma consistente um medicamento com as características desejadas. A aplicação adequada de QbD pode potencialmente proporcionar vários benefícios para o desenvolvimento e fabricação, o que inclui uso mais eficiente de tempo de desenvolvimento e custos; resposta

rápida a qualquer desvio de fabricação; este foco oferece uma base para identificar e compreender as relações entre os diversos fatores de formulação e processos críticos e o desenvolvimento de estratégias de mitigação de risco eficazes (WU et al., 2011).

Infelizmente, a indústria farmacêutica em geral, tem sido hesitante para introduzir sistemas inovadores para o setor de fabricação. Uma razão frequentemente citada é a incerteza regulatória, o que pode resultar da percepção de que o nosso sistema normativo existente é rígido e desfavorável à introdução de sistemas inovadores. Por exemplo, muitos processos de fabricação são tratados como sendo congelada e muitas mudanças de processos são gerenciados através de submissões regulatórias. Além disso, outras questões científicas e técnicas foram levantadas como possíveis razões para esta hesitação (WU et al., 2011).

4.3 Tecnologia Analítica de Processo (PAT)

A Tecnologia Analítica de Processo (PAT) é um sistema para projetar, analisar e controlar os processos de fabricação baseadas em uma compreensão dos princípios científicos e de engenharia envolvidas e identificação das variáveis que afetam a qualidade do produto. A PAT é elemento do QbD, mas pode estar associada a projetos mais tradicionais depois de algumas adaptações no processo.

A iniciativa PAT é consistente com a convicção corrente Food and Drug Administration (FDA) que a qualidade não pode ser testada em produtos. De acordo

com o projecto de orientação FDA, o estado desejado da indústria farmacêutica é que qualidade e desempenho do produto são assegurados através do desenho de processos de fabrico eficazes e eficientes; especificações de produtos e processos são baseados em um entendimento mecanicista de como a formulação eo processo fatores afetam o desempenho do produto; garantia de qualidade em tempo contínuo e real; políticas e procedimentos regulamentares pertinentes são adaptados para acomodar o nível mais atual do conhecimento científico (RANDON, 2012; RATHORE et al., 2010)

Segundo Randon (2012), um objetivo desejado do quadro PAT é conceber e desenvolver processos bem entendidos que irão assegurar uma consistente qualidade predefinida no final do processo de fabricação. Tais procedimentos seriam coerentes com o princípio básico da qualidade do projeto e poderia reduzir os riscos a preocupações de qualidade e regulamentares, melhorando a eficiência. Os ganhos em termos de qualidade, segurança e / ou eficácia irá variar, dependendo do processo e do produto, de forma generalista, pode-se citar:

- Redução dos tempos de ciclo de produção usando medilões de controle online/inline;
- Diminuição de rejeitos, sucata e re-processamento;
- Liberação de lotes em tempo real;
- Aumento da automação, garantindo maior segurança para o operador e redução de erros humanos;

Facilitar o processamento contínuo para melhoraria da eficiência e gerenciamento de variabilidade. Um processo é geralmente bem compreendido quando todas as fontes importantes de variabilidade são identificadas e explicadas; variabilidade é gerenciada pelo processo; e, os atributos de qualidade do produto podem ser previstos com precisão e confiabilidade. Embora os dados decapacidade de processo retrospectivas são indicativas de um estado de controle, estes só podem ser insuficientes para avaliar ou transmitir um entendimento processo. (RANDON, 2012; RATHORE et al., 2010).

4.3.1 FerramentasPAT

Existem muitas ferramentas disponíveis que permitem a compreensão do processo de fabricação e garantia de qualidade. Estas ferramentas, quando ser usadas dentro de um sistema e proporcionar meios eficazes e eficientes para a aquisição de informações. No PAT estas ferramentas podem ser classificadas em (RANDON, 2012; RATHORE et al., 2010):

Ferramentas multivariadas para o projeto, aquisição e análise de dados: Do ponto de vista biológico físicas, químicas, ou, os produtos e processos farmacêuticos são multifactoriais sistemas complexos. Há muitas estratégias de desenvolvimento que podem ser utilizados para identificar formulações e processos ótimos, tais como desenho estatístico de experimentos, metodologias de superfície de resposta, simulação de processos e ferramentas de reconhecimento de padrões, em conjunto com sistemas de gestão de conhecimento. O

conhecimento adquirido nestes programas de desenvolvimento é a base para o design de produtos e processos.

Analisadores de processo: Análise do processo tem avançado significativamente durante as últimas décadas. Alguns analisadores de processo fornecem medidas não destrutivas que contêm informações relacionadas a atributos biológicos, físicos e químicos dos materiais que estão sendo processados. Essas medições podem ser (a) na linha (at-line): Medição em que a amostra é removida, isolado a partir de, e analisados em estreita proximidade com a corrente de processo; (b) on-line: A medição em que a amostra é desviado do processo de fabrico, e pode ser retornada para a corrente de processo; (c) in-line: A medição em que a amostra não é removida da corrente de processo e pode ser invasiva ou não-invasiva.

Analisadores de processo normalmente geram grandes volumes de dados. Certos dados são susceptíveis de ser relevantes para a garantia de qualidade de rotina e decisões regulatórias. Em um ambiente PAT, registros do lote deve incluir informação científica e processual indicativo de alta qualidade de processo e conformidade do produto. Facilidade de acesso seguro a esses dados é importante para o controle em tempo real e garantia de qualidade de fabricação. Avanços em analisadores de processo tornam o controle em tempo real e garantia de qualidade durante a fabricação perfeitamente viável. No entanto, metodologias multivariadas são muitas vezes necessárias para extrair o conhecimento do processo para o controle em tempo real e garantia de qualidade.

Ferramentas de controle de processo: É importante ressaltar que uma forte ligação entre design de produto e desenvolvimento de processos é essencial para garantir o controle efetivo de todos os atributos críticos de qualidade. As estratégias de monitoramento e de controle de processo devem acomodar os atributos de matérias-primas, a capacidade e a confiabilidade de analisadores de processo para medir atributos críticos do processo e produto final. Princípios estatísticos rigorosos devem ser usados nas análises de dados obtidos para garantia de controle de todas as variáveis de processo.

Melhoria contínua e ferramentas de gestão do conhecimento.: Aprendizagem contínua através da coleta e análise de dados sobre o ciclo de vida de um produto é importante. Oportunidades precisam ser identificados para melhorar o processo de produção e auxiliar na tomada de decisões. Uma base de conhecimento pode ser de maior benefício quando é composto por compreensão científica das relações multifatoriais relevantes (por exemplo, entre a formulação, processo e atributos de qualidade), bem como um meio para avaliar a aplicabilidade desse conhecimento em diferentes cenários.

Uma combinação adequada de alguns, ou todos, destes instrumentos pode ser aplicável a uma operação de unidade única, ou a um processo de fabricação e toda a sua garantia de qualidade (RANDON, 2012; RATHORE et al., 2010, FDA, 2015)

4. CONCLUSÃO

O sistema regulatório atual dá pouca ou nenhuma ênfase a um efetivo e eficiente processo de manufatura que assegure a qualidade do produto. O opressivo requisito regulatório impõe notificações para a execução de mudanças mínimas e incrementais nos processos e controles inibindo assim melhorias contínuas e estratégias para implantação da garantia da qualidade em tempo real.

Nesse contexto, o QbD se destaca como sendo uma ferramenta inteligente com base em análise de risco do desenvolvimento farmacêutico. É importante perceber que a especificação existe para o produto farmacêutico tanto no modelo QbT como no QbD. Porém o papel da especificação em um e outro modelo é completamente diferente. No modelo QbT, cada lote deve ser testado contra uma especificação para assegurar sua qualidade e consistência de manufatura. No modelo QbD, lotes não necessitam realmente ser testados contra as especificações uma vez que os controles durante o processo provêm suficientes evidências para que os lotes atinjam a especificação ao serem submetidos aos testes analíticos permitindo a liberação em tempo real dos lotes produzidos. Adicionalmente, a especificação no modelo QbD é somente utilizada para confirmar a qualidade do produto e não de servir como base de demonstração da consistência da produção e dos controles aplicados.

O estudo apresenta algumas limitações. Pouco se encontrou sobre a amostragem na indústria farmacêutica. Relativamente a trabalhos futuros, poderá ser interessante realizar uma comparação entre as principais técnicas de

amostragem e compará-las em termos de custo, aplicabilidade e confiabilidade.

A escolha do plano de amostragem poderá, por exemplo, ser realizada de maneira prática considerando a escala de produção, o tipo de produto e a complexidade do processo. Sugere-se, para futuras investigações, o estudo posterior que ressalte as especificidades da indústria farmacêutica, com recolha de dados destas empresas e, posterior análise de dados e conclusões sobre casos práticos.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA. RDC nº 17. p. 1–63, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 5425. 1985a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 5426. 1985b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR ISO 10017. 2000.

FDA. No Title. Disponível em: www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/Manufacturing/QuestionsandAnswersonCurrentGoodManufacturingPracticescGMPforDrugs/ucm072006.htm
Acessado em 2015.

FERNANDES, A. Influência da gestão da qualidade no desempenho inovador. Revista Brasileira de Gestão de Negócios, v. 25, p. 1806-4892, 2014.

GARCÍA APONTE, O. F.; VALLEJO DÍAZ, B. M.; MORA HUERTAS, C. E. La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. Estudios Gerenciales, 2015.

L. X. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. Pharmaceutical Research, v. 25, n. 4, p. 781-791, 2008.

MEYER, P. L. Probabilidade: Aplicações à Estatística. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1983.

MONTGOMERY, D.C., Runger, G.C. Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2009.

OLIVEIRA, K. D; ALMEIDA, K. L.; BARBOSA, T. L. Amostras Probabilísticas e Não Probabilísticas: Técnicas e Aplicações na Determinação de Amostras. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, 2012.

RANDON, J. Master's degree: From analytical science to process analytical technology Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012.

RATHORE, A. S., BHAMBURE, R., GHARE, V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010.

WU, H., WHITE, M., KHAN, M. A. Quality-by-Design (QbD): An integrated process analytical technology (PAT) approach for a dynamic pharmaceutical coprecipitation process characterization and process design space development. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011.

CAPÍTULO V

BIOMARCADORES NO PROCESSO DE P&D DE NOVOS MEDICAMENTOS: APLICAÇÃO EM LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

Camila Ficker Sabino Santos¹

Breno Caldas de Araújo²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: camila.ficker@gmail.com

RESUMO – *O objetivo deste trabalho foi revisar e descrever a importância dos biomarcadores no processo de P&D de novos medicamentos e aplicação destes nas LMAs. A metodologia utilizada baseou-se em pesquisa bibliográfica fundamentada nos descritores biomarcadores, indústria farmacêutica, desenvolvimento de medicamentos e leucemia mieloide aguda. Foi*

possível concluir que os biomarcadores desempenham um papel essencial no desenvolvimento de medicamentos como ferramentas para monitorar a toxicidade do fármaco, comprovar o mecanismo de ação do composto, indicar o melhor medicamento a ser utilizado, e prever a eficácia. Nas LMAs avanços na descoberta de marcadores moleculares estão emergindo com rapidez e o próximo passo na melhoria dos resultados para os pacientes com esta doença será mais provável a partir da introdução desses biomarcadores para auxiliar os tratamentos existentes. Não menos importante, a utilização de biomarcadores para as indústrias e empresas farmacêuticas permite a gestão prudente dos custos, facilitam os negócios e as tomadas de decisões.

Palavras chave: Leucemias, Biomarcadores, Estudo clínico, medicamentos.

1. INTRODUÇÃO

Os biomarcadores, indicadores quantitativamente mensuráveis de processos biológicos ou patogênicos, desempenham um papel importante na indústria farmacêutica e estão assumindo um papel cada vez maior na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (ZOLG et al., 2004).

Esses biomarcadores têm sido desenvolvidos como testes não invasivos e quando validados podem ser utilizados para a detecção precoce e indicação de riscos de doenças. Ademais, também podem ser utilizados para

o acompanhamento da progressão, recorrência e classificação de subtipos de doenças e fornecer informações para os tratamentos mais adequados (QUIN et al., 2014). No desenvolvimento de fármacos os biomarcadores podem ser úteis para avaliar como funciona um determinado medicamento, qual a dose mais eficaz, ajudar a determinar a sua segurança e identificar grupos de doentes que poderão se beneficiar com o tratamento desse fármaco (MCCORMICK et al., 2007).

O perfil da oncologia está mudando rapidamente com o aumento da utilização de biomarcadores para a identificação de alvos críticos envolvidos nas características do câncer. O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, em particular aqueles que têm as vias moleculares como alvo chave, está minimizando o tratamento de pacientes que utilizam medicamentos ineficazes e potencialmente tóxicos (SMITH et al., 2014).

No ramo da onco-hematologia para as Leucemias Mieloides Agudas (LMAs) os avanços no tratamento têm sido modesto nas últimas décadas, o que reflete a complexidade e a natureza agressiva da LMA (SHOWEL et al., 2014). Há algumas razões para isto, mas a principal entre elas é a considerável heterogeneidade da doença e a escassez de biomarcadores validados, principalmente marcadores moleculares que podem ser utilizados para prever os resultados clínicos e a capacidade de resposta às terapias (IM et al., 2014).

Esta revisão da literatura irá abordar sobre as definições e classificações de biomarcadores, tipos de biomarcadores utilizados na oncologia, aplicação dos biomarcadores nas diferentes fases no desenvolvimento de medicamentos na oncologia, com o foco principal nos potenciais biomarcadores utilizados em Leucemias Mieloides Agudas.

Neste contexto, esta revisão contribuirá para esclarecer a importância dos biomarcadores para a oncologia no processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos, principalmente para as LMA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada revisão da literatura nacional e internacional utilizando os bancos de dados SCIELO e PUBMED onde foram selecionados artigos publicados nos últimos dez anos (2005-2015) abordando o tema biomarcadores. A estratégia de busca utilizada adotou o vocabulário estruturado dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), utilizando os termos indexados: biomarcadores (biomarkers), indústria farmacêutica (pharmaceutical industry), desenvolvimento de medicamentos (drug development), leucemia mielóide aguda (acute myeloid leukemia).

A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais, artigos de revisão, editoriais, diretrizes escritos na língua inglesa e portuguesa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O processo de desenvolvimento de um medicamento

O processo de regulamentação de um medicamento é longo, rigoroso e tem um custo elevado para a indústria farmacêutica. Ele deve cumprir diversas etapas, desde as que antecedem seu uso por seres humanos até o acompanhamento após o lançamento do medicamento, que comprovem que aquele produto não incorrerá em reações prejudiciais à vida das pessoas (figura 1). Esse processo é chamado de estudo clínico (ANVISA).

O estudo clínico possui duas fases: a pesquisa pré-clínica e clínica (figura 2). A fase pré-clínica tem o objetivo de verificar se a substância candidata a fármaco é eficaz e segura, além de analisar como a nova substância se espalha pelo corpo, como é eliminada e sua segurança. Geralmente o estudo pré-clínico é realizado primeiramente *in vitro* (ensaios laboratoriais sem o uso de animais) e posteriormente *in vivo* (ensaios laboratoriais que utilizam animais); trata-se da etapa mais importante nesta fase. Para tanto, são estudados vários modelos animais (ANVISA).

Figura 1 - Etapas do Processo e Desenvolvimento (P&D) de medicamentos.



Fonte: <http://farmaumesp.blogspot.com.br/>

Figura 2 - Fases de um estudo clínico.

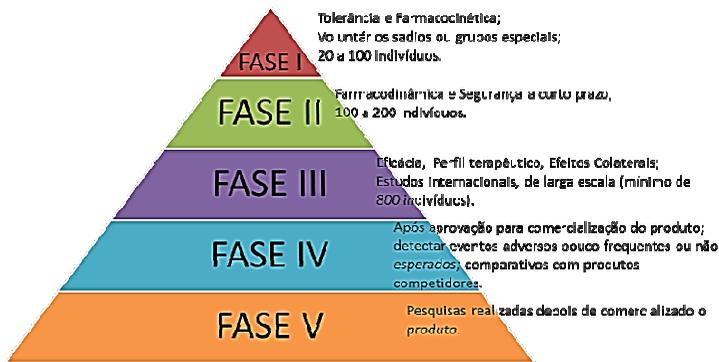


Fonte: MALUF et al, 2013.

Finalizados os testes pré-clínicos, um novo medicamento que demonstra evidências da atividade terapêutica desejada e grau de toxicidade aceitável é levado para a fase clínica de desenvolvimento, que

envolve indivíduos saudáveis e pacientes com a doença ou condição clínica para a qual o medicamento poderá ser útil. A pesquisa clínica também é dividida em fases, conforme ilustrado na figura 3 (MALUF et al., 2013).

Figura 3 -Fases da pesquisa clínica.



Fonte: ANVISA

3.2Aplicação dos biomarcadores em LMAs

Geralmente, o diagnóstico de LMA inicia-se a partir de uma suspeita clínica e se baseia na avaliação do sangue periférico e da medula óssea (BAIN, 2003). Embora a morfologia seja um biomarcador fundamental para o diagnóstico, outros biomarcadores que podem ser identificados com técnicas adicionais como a imunofenotipagem, avaliaçãocitogenética e estudos de genética molecular, tornaram-se essenciais (SILVA et al., 2006).

A imunofenotipagem é realizada por meio de anticorpos monoclonais marcados, que reconhecem epítopos específicos de antígenos celulares. As técnicas empregadas na imunofenotipagem podem ser a citometria de fluxo ou a imunocitoquímica. A importância da imunofenotipagem reside, principalmente, no diagnóstico das LMA M0 e M7, mas também em alguns casos de M5a, além de auxiliar no diagnóstico das LMA M3, LMA M2 e LMA M1/M2. A figura 6 resume os principais marcadores imunofenotípicos relacionados aos subtipos de LMA (BAIN et al., 2002; MARTINS et al., 2000).

A citogenética e os estudos moleculares frequentemente detectam anormalidades dentro do clone leucêmico. Estes marcadores citogenéticos também podem ser utilizados como biomarcadores e podem sugerir o diagnóstico e/ou o prognóstico. A análise citogenética é convencionalmente realizada pela análise microscópica dos cromossomos das células da medula óssea durante a metáfase (SILVA et al, 2006). A investigação por genética molecular é realizada através da análise do DNA por meio de técnicas, como Southern blot ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ou na análise do RNA por PCR da transcriptase reversa (RT-PCR) e também por PCR em tempo real (RT-qPCR). A finalidade da investigação por genética molecular pode ser tanto o estabelecimento da clonalidade, pela detecção da recombinação de genes que expressam imunoglobulinas, quanto pela identificação de uma

recombinação molecular característica de um determinado tipo de LMA (BAIN, 2003).

Outro potencial biomarcador para as LMA são as citocinas. A expressão de citocinas pode ser considerada como critério de avaliação da doença e tratamento. No estudo de Sepehrizadeh et al., (2014) foi avaliado a expressão das citocinas IL-1 β , IL-10, IL-8, TNF- α , INF- γ em pacientes com LMA antes e depois da quimioterapia. O resultado desse estudo mostrou que há um aumento significativo no nível de expressão de INF- γ após quimioterapia enquanto que a expressão de IL-1 β , IL-10 e IL-8 é reduzida após a quimioterapia, em comparação com o estado antes da quimioterapia, demonstrando promissores potenciais biomarcadores de monitoramento de algumas citocinas.

MicroRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes de 19-24 nucleotídeos que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (BARTEL, 2009), foram identificados como críticos para a manutenção da função das células-tronco hematopoiéticas e o desenvolvimento da linhagem celular (KLUIVER et al., 2007; VASILATOU et al., 2010). O perfil de expressão gênica de blastos de pacientes com a doença revelou desregulação generalizada de miRNAs. Esses estudos também estabeleceram associações entre diferentes perfis de miRNAs e o subtipo molecular específico da doença, sugerindo seu potencial papel na patogênese da LMA (DIXON- MCIVER et al., 2008; GARZON et al., 2008; JONGEN-LAVRENCIC et al., 2008). Embora vários

miRNAs estejam desregulados na LMA, somente alguns tem demonstrado desempenhar papel funcional na leucemogênese mieloide, incluindo miRNAs-125, -146, -155, -142, e -29. Assim, a compreensão da regulação complexa dos miRNAs que têm sido implicados na LMA pode proporcionar novas vias para o desenvolvimento terapêutico (KHALAJ et al., 2014)

Em outro estudo foram analisados e identificados 6 miRNAs circulantes no soro de pacientes com LMA em diferentes subtipos desde M1 até M5, cuja concentrações foram significativamente desreguladas positivamente nos soros dos pacientes com LMA quando comparado com controles saudáveis. A descoberta de que miRNAs séricos podem servir como potenciais biomarcadores supera o problema de coletar amostras de tecido através de procedimentos invasivos como biópsia ou cirurgia, ou seja, miRNAs como biomarcadores permitiria a análise compreensiva das doenças de uma maneira menos invasiva (ZHI et al., 2013).

Avanços no tratamento, que se reflete em ganhos de sobrevida, têm sido modestos nas últimas décadas, o que reflete a complexidade e a natureza agressiva da LMA (SHOWEL et al., 2014). Há algumas razões para isto, mas a principal entre elas é a considerável heterogeneidade da doença e a escassez de marcadores moleculares que podem ser utilizados para prever os resultados clínicos e a capacidade de resposta às terapias.

O sequenciamento em larga escala recente de genomas LMA está oferecendo oportunidades para a

estratificação dos pacientes e abordagens personalizadas para tratamento que são baseados em padrões de mutação individuais (IM et al., 2014). Neste contexto, nos últimos anos, têm ocorrido várias mudanças no diagnóstico e tratamento da LMA. As antigas categorias de prognósticos “favoráveis, intermediárias e desfavoráveis”, que foram baseados em grupos de risco de citogenética, não são mais adequadas. Os avanços nas tecnologias da genômica identificaram LMA como uma doença genética altamente heterogênea, e um número crescente de pacientes com LMA agora podem ser classificados em subgrupos clínico-patológicos distintos com base em seus defeitos genéticos moleculares subjacentes que podem ser vistos como biomarcadores (ROBOZ, 2011).

As principais alterações moleculares são mutações nos genes que codificam FLT3, NPM1, CEBPA e c-Kit. A maioria das mutações do gene receptor tirosina quinase FLT3 são duplicações em tandem (ITD); menos frequentes são as mutações que envolvem o domínio tirosina quinase (TKD). Apresentam um papel importante na proliferação, sobrevivência e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas e por isso, têm sido associados a um fenótipo de doença agressiva e resultados insatisfatórios. FLT3-ITD tem uma prevalência de 20 a 25% em adultos jovens, e cerca de 35% na população idosa (JONGE et al., 2011; LEVIS, 2013; ROBOZ, 2011).

CEBPA, um fator de transcrição crucial para o desenvolvimento de células progenitoras mieloides para

neutrófilos diferenciados, está mutado em 10-18% dos casos de LMA. Pacientes com mutações bialélicas em CEBPA e sem a mutação concomitante FLT3-ITD, estão associados a um prognóstico favorável (MEYER et al., 2014).

A proteína nucleolar nucleofosmina1 (NPM1) está envolvida em muitas funções celulares, tais como biogênese do ribossomo, reparo do DNA, e regulação da apoptose. As mutações no gene NPM1 estão entre as alterações genéticas mais comuns em LMA (o que ocorre em 25-35% dos doentes), especialmente nas LMA citogeneticamente normais (presente em 45-64%). Na ausência de FLT3-ITD, mutações NPM1 estão associados a uma melhor evolução para os pacientes com LMA com citogenética normal, mesmo nos pacientes com idade superior a 60 anos. A genotipagem para NPM1 informa as decisões de tratamento também em pacientes idosos, pois identifica quem pode se beneficiar de quimioterapia intensiva (MARCUCCI et al., 2011; MEYER et al., 2014).

KIT (CD117) é outro tipo de receptor tirosinaquinase III que serve como receptor para o fator de células estaminais. KIT é expressa na superfície de blastos leucêmicos em 80% dos pacientes com LMA. As mutações são encontradas em 20-30% dos citogeneticamente favoráveis no núcleo do fator de ligação nas LMAs, e estão associados com o aumento da incidência de recaída e evolução inferior na maioria dos estudos, particularmente em doentes com t (8; 21) (PASCHKA et al., 2006). O efeito das mutações KIT no

prognóstico desfavorável destas leucemias destaca a importância da análise mutacional detalhada dentro dos grupos de risco da citogenética para terapia otimizada nos subconjuntos molecularmente definidos de LMA (MEYER et al., 2014).

Mutações em isocitratodesidrogenase 1 (IDH1) e em seu homólogo mitocondrial IDH2 foram identificadas. Ambos IDH1 e IDH2 são enzimas importantes no ciclo de citrato (ciclo de Krebs) (JONGE et al., 2011). Recentemente, mutações altamente recorrentes no DNA do gene metiltransferase DNMT3A foram descobertas e foram associadas com má evolução na LMA, independentemente (LEY et al., 2010). Outras mutações como aquelas envolvendo os genes PTPN11 e RUNX1 são relativamente raras (isto é <5% dos casos), tornando a sua relevância para abordagens de tratamento de estratificação de risco incerto (GRIMWADE et al., 2009).

Em resumo, pode-se perceber que os marcadores moleculares estão emergindo com rapidez e que o próximo passo na melhoria dos resultados para os pacientes com esta doença será mais provável a partir da introdução de terapias-alvo nos tratamentos existentes. Atualmente, o Ácido All-transRetinóico (ATRA) e o Arsênico são os únicos tratamentos que são verdadeiramente orientados para uma mutação específica (LEVIS, 2013). No entanto, mais de 20 moléculas pequenas inibidoras de tirosina-quinase FLT3 foram descritos na literatura, muitos dos quais têm avançado para ensaios de fase II e III de testes clínicos com

atividade clínica promissora, apesar de nenhuma ter sido ainda aprovada para uso clínico. Uma ou mais destes fármacos provavelmente serão incorporados com sucesso em regimes de quimioterapia e transplante de pacientes LMA com FLT3-ITD em um futuro próximo (KNAPPER, 2007; PRATZ et al., 2014). Do mesmo modo, os inibidores de IDH têm mostrado ter atividade em modelos pré-clínicos de LMA-IDH mutado. Além disso, dados clínicos recentes sugerem que esses inibidores de IDH2 podem induzir a remissão em alguns pacientes com recidiva e refratária (LOSMAN et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

Não há dúvida de que os biomarcadores podem desempenhar um papel essencial no desenvolvimento de medicamentos como ferramentas para monitorar a toxicidade do fármaco, comprovar o mecanismo de ação do composto, indicar o melhor medicamento a ser utilizado, e prever a eficácia. Não menos importante, a utilização de biomarcadores para as indústrias e empresas farmacêuticas permitem a gestão prudente dos custos, facilitam os negócios e tomadas de decisões e permitem a expansão de terapia eficaz para populações de pacientes mais amplas.

Esta alteração fundamental na estratégia de desenvolvimento de medicamentos permitiria acelerar ainda mais a aprovação de terapias específicas para pacientes com câncer e, assim, acelerar a progressão para medicina personalizada na oncologia. Assim, melhorias

na sobrevida global para pacientes com LMA poderão aumentar por causa da introdução dessas terapias direcionadas com esta plataforma de tratamento. Portanto, biomarcadores no desenvolvimento de fármacos e na medicina personalizada parecem ser o futuro da indústria de medicamentos.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA.<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>. Acessado em 20 de Maio de 2014.

BAIN, B. Diagnóstico em Leucemias. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

BAIN, B et al. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clinical & Laboratory Haematology*, v. 24, p. 1-13, 2002.

BARTEL, D et al. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, v. 136, p. 215–233, 2009.

DIXON-MCIVER, A et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS ONE*, 3:e2141, 2008.

GARZON, R et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, v.111, p. 3183–3189, 2008.

GRIMWADE, D et al. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology American Society of Hematology Education Program*, p. 385-395, 2009.

JONGE, H et al. Gene expression profiling in acute myeloideleukaemia. *The Journal of Medicine*, v. 69, n. 04, p. 167-176, 2011.

JONGEN-LAVRENCIC, M et al. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*, v. 111, p. 5078–5085, 2008.

KHALAJ, M et al. Pathogenic microRNA's in myeloid malignancies. *Frontiers in Genetics*, v. 5, n. 361, p. 1-18, 2014.

KLUIVER, J et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene*, v. 26, p. 3769–3776, 2007.

KNAPPER, S. FLT3 inhibition in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 138, n. 6, p. 687–99, 2007.

LEVIS, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology American Society of Hematology Education Program*, v. 2013, p. 220-226, 2013.

LEY, T et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 25, p. 2424-2433, 2010.

LOSMAN, J et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science*, v. 339, p. 1621-1625, 2013.

QUIN, C et al. Therapeutic target database update 2014: a resource for target therapeutics. *NucleicAcids Research*, v. 42, p. D1118-D1123, 2014.

SEPEHRIZADEH, Z et al. Assessment of cytokine expression profile in acute myeloid leukemia patients before and after chemotherapy. *Turkish Journal of Hematology*, v. 31, p. 149-154, 2014.

SHOWEL, M et al. Advances in treating acute myeloid leukemia. *F100Prime Reports*, v. 6, p. 96, 2014.

SILVA, G et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*, v. 42, n. 2, p. 77-84, 2006.

SMITH, A et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer*, v. 105, p. 1684-92, 2011.

VASILATOU, D et al. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *European Journal of Haematology*, v. 84, p. 1-16, 2010.

ZHI, F et al. Identification of circulating MicroRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. *Plos One*, v. 8, n. 2, e56718, 2013.

ZOLG, J et al. How Industry Is Approaching the Search for New Diagnostic Markers and Biomarkers. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 3, n. 4, p. 345-354, 2004.

CAPÍTULO VI

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM INDÚSTRIAS DE BIOTECNOLOGIA

Charles Fernandes dos Santos Simões¹

Simão Kalebe Silva de Paula²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

E-mail de contato:charles.fernandes.s.s@gmail.com

RESUMO - *Biofilmes são caracterizados como uma população microbiana envolvida numa matriz aderente. Na natureza, microorganismos de modo comum aderem a superfícies sólidas, formando microcolônias, e, assim, produzem polímeros extracelulares, retêm outras espécies de células, e, por fim, formam o biofilme. Problemas com biofilmes são muito comuns em indústrias em que materiais químicos e biológicos são manufaturados. O objetivo deste trabalho visou efetuar*

um levantamento bibliográfico sobre biofilmes, sua formação, características e principais microorganismos envolvidos na formação de biofilmes em indústrias de biotecnologia. O biofilme reduz a eficácia na troca iônica e processos de filtração envolvendo membranas. Assim como acelera a corrosão e depositam material de deterioração. Os principais microorganismos produtores de biofilme pertencem aos gêneros Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Algaligenes, Staphylococcus, e Bacillus. Há também microorganismos anaeróbios que possuem a capacidade de produzir biofilmes corrosivos. Cepas de Escherichia coli K-12 dependem de fatores de adesão, que atuam induzindo o processo de amontoamento em biofilmes estruturadas de forma diferente. Sendo assim, a contaminação por biofilmes trata-se de um problema evitando assim significativas perdas no processo industrial.

Palavras chave: Biofilmes, microrganismos, polímeros extracelulares, contaminação, indústrias de biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são caracterizados como uma população microbiana envolvida numa matriz aderente (DAVEY et al., 2000; KAWARAI et al., 2009). Na natureza, microorganismos de modo comum aderem a superfícies sólidas, formando microcolônias, e, assim, produzem polímeros extracelulares, retêm outras espécies de células, e, por fim, formam o biofilme. As bactérias

formam biofilmes essencialmente do mesmo modo em qualquer ecossistema que habitam. A estrutura básica do biofilme é a microcolônia. A estrutura destas microcolônias é complexa e não é apenas influenciada pelas espécies individuais presentes, mas também por sua mútua interação (DONLAN; COSTERNON, 2002). A frequente presença destas estruturas em diversos ambientes gera uma necessidade de cuidado em ambientes nos quais a presença de contaminantes seja indesejada, tais como ambientes hospitalares e industriais, podendo causar graves problemas.

Problemas com biofilmes são muito comuns em indústrias em que materiais químicos e biológicos são manufaturados. Alguns equipamentos e regiões como juntas são locais altamente susceptíveis para seu crescimento, pelo fato de que sujidade e diferentes tipos de nutrientes podem se acumular sobre o equipamento de modo facilitado (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992). Um dos quesitos fundamentais para a implantação de uma indústria inclui a escolha dos materiais de superfície, pois determinados tipos de materiais como borrachas e derivados de teflon podem tornar-se substrato para tais microorganismos (PIRBAZARIM, 1990).

Entende-se que a composição de espécies e as interações entre espécies envolvidas podem ser considerados de acordo com os fatores bióticos que estão relacionados à determinação da estrutura do biofilme (STOLZ; RIDING; AWRAMIK, 2000). E uma elucidação dos processos de biofilme pode depender de

um entendimento das interações fisiológicas de microcolônias dentro de um biofilme desenvolvido (JAMES et al., 1995). A avaliação do perfil das respectivas estruturas, classificando-as de acordo com as espécies microbianas frequentemente envolvidas, tipos de materiais utilizados e o procedimento industrial a ser implantado se faz importante para a implantação de uma planta de indústria focada na produção de insumos biotecnológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biofilmes

Os biofilmes são definidos como comunidades de microorganismos imobilizados em conjunto sobre uma matriz de polímeros extracelulares de origem microbiana, sendo esta matriz normalmente uma superfície que permita a aderência, isto representa a maior parte de toda a vida microbiana, seja em quantidade como em sua atividade (DAVEY et al., 2000; KAWARAI et al., 2009). Tal estrutura é formada de modo natural em qualquer superfície sólida em contato com alguma quantidade de água não esterilizada. Na natureza, microorganismos normalmente aderem a superfícies sólidas (especialmente na interface sólido-líquido), formando microcolônias, e, desta maneira, produzem substâncias poliméricas extracelulares, retêm detritos e outras espécies de células, e, por fim, formam o biofilme (DONLAN; COSTERNON, 2002). Outros tipos de agregados

microbianos (também sob a forma de microcolônias), sejam presentes em separação de fases ar-líquido ou líquido-líquido, sejam em agregados flutuantes como flocos ou grânulos, também se enquadram nesta definição.

Os biofilmes possuem significativa importância em diversas atividades do ser humano. Temos como exemplo as estações de tratamento de águas e efluentes as quais removem organismos patogênicos e reduzem a matéria orgânica presente através de interação com biofilmes. Assim como vários bioprocessos também lançam mão dessas estruturas. Neste último caso podemos citar processos tais como a produção de vinagre, produção de ácido cítrico (SAKURAI et al., 1997), obtenção de produtos farmacêuticos através da produção de metabolitos secundários com ações terapêuticas (OKITA; KIRWAN, 1986), e em indústrias de siderurgia, onde processos biológicos possibilitam a extração de metais a partir de amostras de minério (RAWLINGS, 2002). Entretanto, seu crescimento não desejado, apresenta algumas propriedades negativas em diversas áreas. Podem ocorrer danos em equipamentos devido à corrosão causada por biofilmes, contaminação de produtos intermediários e/ou acabados, perdas energéticas relacionadas por causa do aumento do atrito, resistência somada a uma transferência de calor e perdas de pressão, estas últimas acabam por prejudicar o rendimento de todo o processo, conseqüentemente onerando a produção, dificultando também etapas

envolvendo controle de qualidade e validação (JASS; WALKER 2000).

Esses problemas citados são acrescidos pela frequente resistência aos métodos de desinfecção e limpeza triviais em indústrias, em comparação aos microorganismos livres (SIMOES et al., 2003). Isso acaba gerando novos problemas, sendo que desta vez de natureza ambiental, pois os métodos convencionais não solucionam de maneira satisfatória a questão da limpeza, conseqüentemente requerem por vezes doses elevadas de desinfetante. (JASS; WALKER, 2000). Outro grande problema envolvendo tal estrutura trata-se da contaminação microbiana em canalizações gerando uma contaminação das águas. Além disso, a acumulação de biofilmes em cascos de navios gera um maior atrito, aumentando os gastos de combustível (SCHULTZ; SWAIN, 2000).

2.2 Perfil e composição dos biofilmes

Em sua formação, podem ser empregadas diversas classes de compostos de origem natural, tais como açúcares, proteínas e lipídeos, entre outros. Assim, é possível estabelecer uma classificação para os biofilmes de acordo com sua base, podendo ser esta composta de proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou misturas de polímeros (produzidos pela mistura de alguns dos componentes mencionados acima) (KESTER; FENNEMA, 1986).

Biofilmes desenvolvidos a partir de polissacarídeos, especialmente por EPS, apresentam

adequadas propriedades de natureza tanto mecânicas quanto organolépticas, também formam barreiras efetivas contra aromas e gases de baixa massa molar, por exemplo, oxigênio e dióxido de carbono devido, isto justamente por causa da firme adesão das moléculas pela formação de uma malha de estrutura ordenada através de ligações intermoleculares, especialmente as de hidrogênio (DE OLIVEIRA, 2009). Esta matriz de EPS é primariamente diferenciada entre alguns grupos de bactérias, as de natureza polissacarídea ou proteica, também conhecida como glicocálix, expõe-se exteriormente à membrana externa das Gram-negativas, já as de peptídeoglicano é predominante na parede celular das Gram-positivas, sendo esta última sintetizada por polimerases, construindo uma estrutura complexa bem hidratada (SURMAN et al., 1996). Estes EPS secretados por bactérias possuem um papel fundamental na estrutura do biofilme bacteriano e têm demonstrado relação com a virulência de algumas espécies (COSTERTON et al., 1999).

2.3 Mecanismos de formação de biofilmes

Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas desde os primórdios da microscopia, porém a teoria geral relacionando a existência e as características dos biofilmes só foi formalizada em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). A aderência bacteriana, seja em uma superfície abiótica (objetos inanimados e inertes) ou biótica (tecidos de organismos vivos), configura-se na primeira etapa de formação de biofilmes

e é avaliada como um processo bastante complexo. Geralmente, esta adesão (também denominada adesão reversível) entre bactérias e superfícies abióticas ocorre através de ligações e interações físico-químicas não específicas, ao passo de que a adesão a superfícies bióticas é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações do tipo ligante-receptor (DUNNE, 2002; DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Levando em conta as superfícies abióticas, a adesão inicial das células de vida livre à superfície ocorre de maneira aleatória, através do movimento comum a bactérias e partículas suspensas, chamado de browniano e da força gravitacional ou, de modo direcionado, através de quimiotaxia e mecanismos de motilidade, comumente através de flagelos e *pili* (DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). O estágio primário de adesão é deste modo, guiado por interações do tipo físico-químicas não específicas entre a bactéria e a superfície de contato, incluindo interações eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (PAVITHRA; DOBLE, 2008; DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

A segunda etapa do processo de adesão bacteriana é chamada de adesão secundária ou também adesão irreversível. Nesse caso, os microorganismos que estão fracamente ligados à superfície finalizam o processo de adesão, com a produção da matriz de EPS. Durante esse processo, os microorganismos tornam-se capazes de se ligar a células seja da mesma espécie ou de diferentes

espécies, formando blocos de agregados que estarão solidamente ligados ao material (STOODLEY et al., 2002; DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Dentro de um biofilme, as bactérias, isoladamente apenas se enquadram uma pequena fração (5-35%) do total do volume do biofilme, sendo o restante composto de EPS (POZO; PATEL, 2007; DA SILVA TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

2.4 Biofilmes em indústrias

Os processos industriais são confrontados com problemas envolvendo biofilmes em muitas fases. Isto devido ao fato de que o biofilme reduz a eficácia na troca iônica e processos de filtração envolvendo membranas (WHITTAKER, 1984). Assim como acelera a corrosão e depositam material de deterioração, por exemplo, em sensores e detectores comuns em indústrias de grande porte.

Como visto anteriormente, um dos fatores que mais influenciam na formação dessas estruturas é a qualidade da superfície e, especialmente, a sua suavidade. A existência de rachaduras, fissuras, juntas e articulações acabam por promover pontos mais vulneráveis para a acumulação de biofilme. É um pouco alarmante que patógenos como *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp., assim como o famigerado gênero *Listeria*, têm demonstrado capacidade em produzir complexos de biofilme e, portanto, criar problemas graves a respeito de desinfecção e limpeza nos materiais de superfície

utilizados na indústria de alimentos (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1991).

Entre os sistemas presentes na indústria que podem ser contaminados por biofilmes, encontram-se os sistemas de arrefecimento, sendo eles abertos ou fechados. Em sistemas abertos a água é tirada diretamente de fontes naturais, tais como mares e rios, e a água é devolvido após a circulação no sistema de arrefecimento. Em sistemas fechados há um sistema de circulação envolvendo transferência de calor entre o processo e a fonte de abastecimento. Os níveis de microorganismos podem ser controlados por meio de uma limpeza mecânica e química regulares e tratamento com biocidas. Em contraste, a higiene em sistemas abertos é difícil de controlar e tratamentos especiais de filtração devem ser usados. O tratamento com os biocidas não pode ser utilizado uma vez que a água é retornada para a fonte de água (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1991).

Já em indústrias que trabalham com biotecnologia através de processos fermentativos, a formação de biofilmes gera problemas de higiene em vários graus, como em superfícies, em membranas, e em sondas e outros dispositivos. Incrustações e a acumulação de proteínas são problemas mais comuns em técnicas de filtração, por exemplo, em equipamento de ultrafiltração e em membranas (CHAMBERLAIN; JOHAL, 1988). Bloqueios no equipamento de filtragem normalmente não são causados pelos microorganismos em si, mas pelos biopolímeros e sedimentos que são ricos em proteínas.

2.5 Microorganismos formadores de biofilmes

Os principais microorganismos produtores de biofilme pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Algaligenes*, *Staphylococcus*, e *Bacillus*. Há também microorganismos anaeróbios que possuem a capacidade de produzir biofilmes corrosivos (LECHEVALLIER et al., 1987).

As espécies de microorganismos produtores variam de acordo com o ambiente e sistemas sob os quais estão relacionados. No caso de sistemas de arrefecimento, os microorganismos obtêm nutrientes a partir da massa de algas, iniciando assim um círculo vicioso como descrito. Os mais comuns em águas de arrefecimento correspondem com a formação de musgo são *Pseudomonas* e *Gallionella* (MATTILA-SANDHOLM; WIRTANEN, 1992).

Em relação às cepas de *Escherichia coli*, foi descoberto que a presença de plasmídeos de transferência IncF constitutivos foram responsáveis por induzir seu desenvolvimento gerando estruturas similares às produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, foi indicado a transmissão de sinal célula-célula mediada por proteína auto-indutora 2 (IA-2) não é necessária para a diferenciação de *E. coli* dentro de um biofilme. Então, sugeriu-se o desenvolvimento e maturação do biofilme *E. coli* K-12 depende de fatores de adesão, que atuam induzindo o processo de amontoamento em biofilmes estruturadas de forma diferente (REISNER et al., 2003).

3. CONCLUSÃO

Diante dos pressupostos citados no decorrer deste trabalho, podemos concluir então que:

- A composição e matriz dos biofilmes variam de acordo com a superfície e as espécies de microorganismos envolvidos, apresentando predominantemente uma matriz polissacarídica com anexos protéicos;
- Os gêneros de microorganismos mais comuns em biofilmes industriais tratam-se de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Algaligenes*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*;
- As principais fontes de contaminação são resíduos aderidos aos equipamentos devido a falhas de higienização, o sistema de abastecimento de água e de alimentação de insumos e matérias-primas;
- Em microorganismos geneticamente modificados pode haver a transmissão de genes constitutivos através de *pili* gerando uma comunicação célula-célula;
- Sendo assim, a contaminação por biofilmes trata-se de um problema muito complexo e possui a necessidade de ser analisado caso a caso para serem tomadas as medidas cabíveis, evitando assim significativas perdas no processo industrial.

4. REFERÊNCIAS

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. *Scientific American*, v. 238, p. 86-95, 1978.

DA SILVA TRENTIN, Danielle; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate¹. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiology Molecular Biology Reviews.*, v. 64, p. 847–867, 2000.

DE OLIVEIRA, A. F. *Desenvolvimento, caracterização e aplicação de biofilmes e esferas obtidos a partir de carboximetilcelulose e alginato de sódio em processos de liberação controlada de nutrientes*. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n. 15, p. 167, 2002.

DUNNE, W. Michael. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

JAMES, G. A.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, J. W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 15, p. 257-262, 1995.

JASS, J.; WALKER, J. T. Biofilms and biofouling. *Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control*, p. 1-12, 2000.

KAWARAI, T.; FURUKAWA, S.; NARISAWA, N.; HAGIWARA, C.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 6, p. 630–635, 2009.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*, 1986.

LECHEVALLIER, Mark W.; BABCOCK, Timothy M.; LEE, Ramon G. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 12, p. 2714-2724, 1987.

MATTILA-SANDHOLM T.; WIRTANEN, G. Mikrobien muodostaman biofilmin esiintymisilmiöt teollisuudessa, In: *Biofilm formation in the industry*, TEKES, Helsinki, 1991, p. 53.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the Industry: a review. *Food Reviews International*, v. 4, n. 8, p. 573-603, 1992.

OKITA, W. B.; KIRWAN, D. J. Simulation of secondary metabolite production by immobilized living cells: penicillin production. *Biotechnology progress*, v. 2, n. 2, p. 83-90, 1986.

PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomedical Materials*, v. 3, p. 1-13, 2008.

PIRBAZARI, M.; VOICE, T. C.; WEBER JR. W. J. Waste Hazard. *Materials*, v. 7, p. 239, 1990.

POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 82, p. 204-209, 2007.

RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*, v. 56, p. 65-91, 2002.

REISNER, Andreas et al. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular microbiology*, v. 48, n. 4, p. 933-946, 2003.

SAKURAI, A. et al. Simulation of citric acid production by rotating disk contactor. *Biotechnology and bioengineering*, v. 56, n. 6, p. 689-696, 1997.

SCHULTZ, M. P.; SWAIN, G. W. The influence of biofilms on skin friction drag. *Biofouling*, v. 15, n. 1-3, p. 129-139, 2000.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under

different flow regimes. *Water Science and Technology*, v. 47, n. 5, p. 217-223, 2003.

STOLZ, J. Structure of Microbial Mats and Biofilms, In: *Microbial sediments*, Berlin, p. 3, 2000.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 187-209, 2002.

SURMAN, S. B. et al. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 25, n. 1, p. 57-70, 1996.

WHITTAKER, C.; RIDGWAY, H.; OLSON, B. H. Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from reverse-osmosis membranes. *Applied and environmental microbiology*, v. 48, n. 2, p. 395-403, 1984.

CAPÍTULO VII

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA DENGUE

Cheysa Arielly Biondo¹

Kamila de Melo Vilar²

Klecia Casseiro¹

Rafael Dhalia¹

Luiz Alberto Lira Soares³

¹Centro Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/LAVITE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Departamento de Farmácia, UFPE

E-mail de contato:cheysaarielly@gmail.com

RESUMO – *A dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, devido à sua ampla distribuição geográfica e alta prevalência de infecção. Seu agente etiológico é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae, representado por 4 sorotipos distintos. Esse estudo propõe produzir antígenos NS1 dos 4 sorotipos circulantes através de ferramentas de biologia sintética, tendo como base sequências consenso*

de cepas circulantes isoladas no Brasil. Foram expressados antígenos em sistemas heterólogos (bacterianos) através da clonagem dos genes em diferentes vetores, transformação dos plasmídeos em células competentes, expressão das proteínas recombinantes, sua purificação, eletroforese e imunoensaio para comprovação da expressão. A abordagem metodológica adotada neste trabalho permitiu produzir corretamente proteínas do vírus da Dengue em sistemas heterólogos. As proteínas foram também testadas em relação a sua imunogenicidade. Em paralelo à obtenção das proteínas, foram produzidos anticorpos monoclonais contra as mesmas. Os resultados encontrados serão utilizados para o desenvolvimento de um teste rápido capaz de detectar os quatro sorotipos de dengue, com tecnologia nacional.

Palavras chave: antígeno NS1; Kit diagnóstico; Teste Rápido; SUS.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é considerada a mais importante arbovirose existente e um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a doença. A cada década, o número anual de casos de dengue reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) cresce exponencialmente. A OMS estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em aproximadamente 10 países, de todos os continentes,

exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 22 mil vão a óbito em consequência da dengue (WHO FactSheet, 2014).

A incidência de dengue em todo o mundo aumentou dramaticamente nas últimas décadas. Junto ao aumento das áreas infestadas com o vetor, aumentou também o número de regiões onde ocorre a transmissão da doença e o número de pessoas susceptíveis.

A dengue é transmitida pela picada de fêmeas infectadas de mosquitos hematófagos dos gêneros *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (RODHAIN; ROSEN, 1997), sendo considerada a doença de transmissão vetorial com o maior crescimento no mundo (MACIEL et al., 2008).

O vírus da dengue (DENV) pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*. O gênero *Flavivirus* compreende outros vírus transmitidos por mosquitos e carrapatos. Além da dengue, o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da febre do Nilo ocidental (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) são grandes ameaças à saúde humana em todo o mundo (WHITEHEAD et al., 2007). O vírus da dengue pode ser classificado em quatro sorotipos distintos, sendo eles DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MARTINA et al., 2009).

O vírus DENV é envelopado, contendo um capsídeo denso envolvido por uma bicamada lipídica. Seu genoma é formado por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kb, flanqueado por uma estrutura 5' terminal não

poliadenilada (RICE, 1985). A tradução do RNA genômico resulta em uma poliproteína precursora que, após sucessivas clivagens por proteases do hospedeiro vertebrado e do próprio vírus, resulta na formação de três proteínas estruturais: Capsídeo – C; pré-membrana/Membrana – pM/M; Envelope – ENV; e de sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5(CHAMBERS et al., 1990; PERERA; KUHN, 2008).

Dentre as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, ENV e NS1 são consideradas de extrema relevância por contribuírem muito fortemente para o processo de resposta imunológica desencadeada pelo vírus. ENV participa diretamente do processo de infecção uma vez que medeia a interação e penetração do vírus nas células hospedeiras (BURKE et al., 2001; LINDENBACH et al., 2001), enquanto NS1 pode ser encontrada tanto associada à membrana celular como na sua forma solúvel, em altas concentrações, no soro de pacientes durante a fase inicial de infecção (DUSSART et al., 2006). Como ambas são capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, constituem importantes alvos para o desenvolvimento de vacinas e de kits de diagnóstico (COSTA et al., 2006; KOCHER et al., 2000).

Todos os kits se baseiam em um único antígeno ENV ou NS1, de um único sorotipo, e detectam ou anticorpos contra ENV ou capturam o antígeno NS1 (durante a fase inicial da infecção). Assim, a produção de

antígenos NS1 em laboratório é de grande importância para a validação de novos kits de diagnósticos.

As proteínas são sintetizadas por todas as formas vivas como parte do seu metabolismo natural. A produção de proteínas recombinantes tem aplicação em áreas diferentes, como fins terapêuticos, desenvolvimento de vacinas, estudos básicos ou desenvolvimento de teste de diagnóstico. Com o aparecimento da tecnologia do DNA recombinante e engenharia proteica, enzimas e outras proteínas podem ser obtidas com facilidade e qualidade (ARNOLD, 2009).

O primeiro passo para gerar uma proteína recombinante é a obtenção da sequência gênica (DNA) de uma determinada proteína. Após a subclonagem do DNA em vetores de expressão e a introdução do mesmo num sistema de expressão, a proteína desejada é traduzida. Qualidade, funcionalidade, rapidez e eficiência na produção são consideradas os fatores mais importantes em escolher um sistema de expressão apropriado.

Sistemas de expressão podem ser diferenciados em sistemas procarióticos (bactérias) e eucarióticos (levedura, fungos, células de insetos, células mamíferos, animais transgênicos, plantas transgênicas). Todavia, a expressão nesses últimos, pode ser ainda uma tarefa muito árdua (ARNOLD, 2009). A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é o sistema mais comum utilizado na produção de proteínas recombinantes. Um plasmídeo que contém a sequência da proteína desejada é transformado na bactéria e a expressão induzida. A replicação dos

plasmídeos na bactéria é estável devido à pressão de seleção com um antibiótico como, por exemplo, ampicilina, canamicina ou tetraciclina. Para facilitar a detecção e purificação das proteínas recombinantes, existe uma variedade de etiquetas (*tags*) gerando proteínas de fusão. A curta sequência de DNA da *tag* faz parte do plasmídeo e é traduzida na porção N-ou C-terminal da proteína expressa. Essas etiquetas são utilizadas, por exemplo, para estratégias de purificação por afinidade, como a sequência poli-histidina (HIS-tag). As vantagens no uso de procariotos são um crescimento e expressão rápida, facilidade na cultura, rendimento alto e baixos custos.

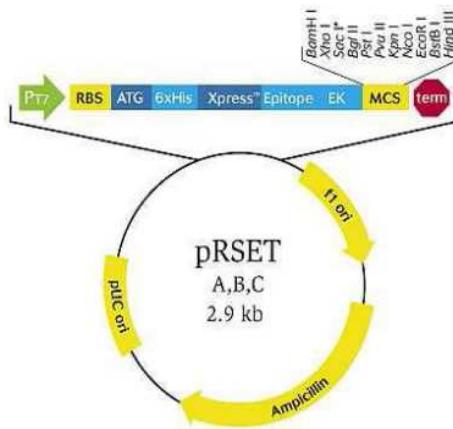
Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo expressar e purificar antígenos recombinantes do vírus da dengue (proteínas NS1) para utilização no desenvolvimento de um kit de diagnóstico através da expressão as proteínas recombinantes em sistema heterólogo, purificação das proteínas, análise e dosagem das proteínas purificadas por gel de SDS-PAGE, e verificação da produção da proteína por ensaios de “Western blot”.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para expressão de antígenos em sistemas heterólogos é necessário um trabalho de clonagem dos genes em diferentes vetores. As sequências gênicas da proteína NS1 dos 4 sorotipos de dengue foram otimizadas e desenhadas sinteticamente para posterior

clonagem. Foi escolhido o vetor de expressão pRSETA. A partir da construção do vetor mais o gene de interesse (figura 1), foi iniciado o trabalho de expressão e purificação das proteínas.

Figura 1 - Representação esquemática do vetor pRSETA.



Fonte: Invitrogen.

2.1 Transformação dos Plasmídeos em Células Competentes

A expressão das proteínas NS1 do vírus da dengue foi realizada em células cálcio-competentes da linhagem BL21 de *E. coli*. Os clones de expressão que

foram previamente produzidos foram transformados nas bactérias para a então produção das proteínas dos 4 sorotipos do vírus da dengue. A transformação dos plasmídeos, ou seja, a introdução do plasmídeo na célula foi realizada através de choque térmico. Para isto, foi adicionado em um microtubo cerca de 3 uL da construção com 50 uL de célula a ser transformada. Essa mistura foi deixada no gelo por 30 minutos, após esse tempo o microtubo foi colocado em banho maria a 37°C por 5 minutos e retornado ao gelo por mais 2 minutos. Após essas etapas as células já transformadas foram semeadas em placas com meio sólido LB contendo ampicilina na concentração de 100 ug/mL e deixadas por cerca de 16 horas em estufa a 37°C.

2.2 Expressão das Proteínas Recombinantes

Algumas condições de expressões foram testadas no decorrer do projeto para otimização do processo, sendo a condição ótima de expressão definida como 25°C, 4 horas de indução a 225 rpm.

As colônias foram inoculadas em 50 mL de meio LB com o antibiótico (ampicilina 50 ug/mL) e cultivadas durante 16 horas a 37°C sob agitação (pré-inóculo). A seguir, foi realizada a leitura da densidade ótica (OD600) e calculado quanto dessa cultura era necessário para realizar um inóculo com uma densidade ótica de 0,1 em 500 mL de meio LBamp. Essa cultura de 500 mL (OD 0,1) foi incubada a 37°C sob agitação (225 rpm) até uma densidade ótica entre 0,5 e 0,8. Após esse período, foi adicionado IPTG (indutor da expressão) na concentração

final de 1 mM e a cultura permaneceu sob agitação a 25°C por mais 4 horas. Após o tempo de expressão, as culturas induzida foram centrifugadas por 30 minutos a 5000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensoem 10 mL de tampão A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 20 mMImidazol, pH 8,0) para então iniciarmos os processos de purificação.

2.3 Purificação das Proteínas

A purificação dos antígenos fusionados a cauda de histidina foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA (Qiagen), seguindo o protocolo desnaturante para proteínas insolúveis, expressas como corpúsculos de inclusão nas células bacterianas.

Para a lise celular o sedimento da cultura foi ressuspendido em tampão A e sonicado(6 pulsos de 30 segundos, com intervalo de 1 minuto entre os pulsos).

Após esta etapa foi realizada uma nova centrifugação de 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 10 mL de tampão B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 20 mMImidazol, 1 mMBmercaptoetanol, 8 M ureia, pH 8,0) e adicionado inibidor de protease na concentração final de 1X, a amostra foi então incubada a 4°C sob agitação por cerca de 16 horas.

Em seguida as células lisadas foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi então incubado com 300 uL da resina de níquel que foi

previamente equilibrada com tampão B, ficando sob agitação a 4°C por 1 hora. A amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi removido por aspiração com auxílio de pipeta e a resina foi transferida para um microtubo e adicionado 600 uL do tampão C (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 50 mM Imidazol, 1 mM β-Mercaptoetanol, 8 M ureia, pH 8,0). Para retirada total da resina três lavagens utilizando 1 mL do tampão C e centrifugado por 2 minutos a 5000 rpm foi realizado. Em seguida foi adicionado 300 uL do tampão D (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 500 mM Imidazol, 1 mM β-Mercaptoetanol, 8 M ureia, pH 8,0) e a resina incubada sob agitação por 30 minutos para eluição da proteína. O tubo foi novamente centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante (proteína eluída) foi recolhido em um novo tubo.

2.4 Eletroforese de Proteínas

As proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-page sob condições desnaturantes, conforme o descrito por Hames e Rickwood (1990). A concentração do gel utilizada foi de 15% para análise dos resultados de expressão das proteínas e também para o gel que foi submetido a transferência para membrana de nitrocelulose, nos ensaios de “Western blot”. Os volumes das soluções utilizadas para os géis de corrida e de empacotamento estão descritos na tabela 1. As amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra de proteína (TA 4X) na proporção 4:1 (quatro partes de amostra para 1 parte de TA 4X).

Tabela 1 - Soluções e quantidades para preparo de gel de poliacrilamida para eluição de amostras proteicas.

Soluções	Gel de corrida 15% (5 mL)	Empacotamento (1 mL)
H ₂ O	1,1	0,68
Acrilamida mix 30%	2,5	0,17
Tris 1,5 M pH 8,0	1,3	---
Tris 1 M pH 6,8	---	0,13
SDS 10%	0,05	0,01
Persulfato de amônio 10%	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

2.4.1 Coloração com azul de Coomassie

Os resultados obtidos após eletroforese das amostras em SDS-PAGE foram observados pela coloração do gel com azul de Coomassie. Os géis foram incubados por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente neste corante, seguido de descoloração, para visualização das bandas.

2.5 Imunoensaio

As proteínas produzidas foram testadas em imunoensaio de “Western blot” utilizando anticorpos anti-histidina para comprovação da sua expressão.

2.5.1 “Western blot”

Os ensaios de Western blot foram realizados a partir da transferência de proteínas em gel SDS-PAGE para membrana de PVDF. O gel e a membrana foram transferidos pelo método semi seco (*semidry*), todos os

elementos foram previamente umedecidos com tampão de transferência. A transferência foi feita por 30 minutos a 25 Volts.

Após o bloqueio das membranas em solução PBS 1X, Tween 20 a 0,05% e leite 5%, por 1 hora, as mesmas foram incubadas com o anticorpo comercial anti-histidina conjugado à peroxidase para detecção na diluição de 1:7000 em solução PBS 1X, Tween 20 a 0,05% e leite 1%, durante aproximadamente 2 hora sob agitação. As membranas foram então lavadas três vezes por 10 minutos com PBS 1X, Tween 20 a 0,05% e a revelação foi realizada através de quimiluminescência utilizando kit “*ImmobilonWestern – Chemiluninescent HRP Substrate*” de acordo com recomendações do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

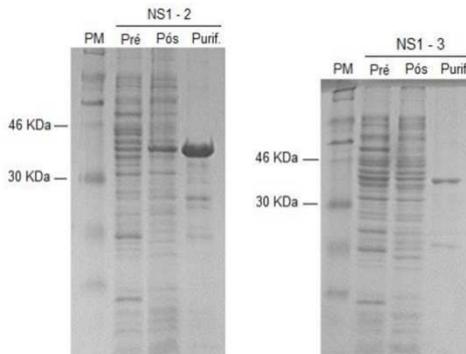
Todas as proteínas recombinantes expressas apresentaram-se na fração insolúvel. A expressão das proteínas na fração insolúvel não é um resultado inesperado, visto que altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* levam ao surgimento de agregados das mesmas (estruturalmente malformadas), referidos como corpúsculos de inclusão.

Estes agregados são pouco solúveis em meio aquoso (KOPITO, 2000). Quando recuperados do lisado celular por meio de centrifugação, os corpúsculos de inclusão são co-sedimentados com debris celulares, incluindo uma alta quantidade de componentes da

membrana e parede celular das bactérias (RUDOLPH; LILIE, 1996).

A expressão do gene de interesse é controlada pela ação do promotor T7, reconhecido especificamente pela T7 RNA polimerase, através da ação do indutor de expressão Isopropil β -D-Tiogalactosídeo (IPTG). A figura 2 mostra a expressão de duas proteínas, onde podemos observar que houve a produção das mesmas, indicada através da presença de uma banda correspondente aproximadamente ao tamanho correto de 45 kDa, sendo possível verificar a expressão da proteína após a adição do indutor IPTG.

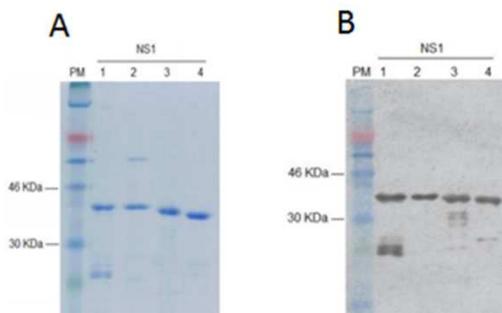
Figura 2 - Perfil eletroforético em matriz de gel 15% SDS-PAGE das expressões das NS1 de DENV 2 e NS1 de DENV 3. PM: Padrão de Peso Molecular (Colorplus); Pré: Extrato de proteínas expressas pela célula sem a adição do indutor IPTG; Pós: Extrato de proteínas expressas pela célula após a adição do indutor IPTG; Purif.: Proteínas insolúveis purificadas.



A observação do gel da NS1-2 deixa nítida a expressão da proteína após a adição do IPTG, e uma forte banda da proteína purificada. Já em relação ao gel da NS1-3, a expressão no extrato de proteínas não fica muito evidente em decorrência da provável redução na quantidade de proteína expressa nestas condições, permitindo a identificação visual da banda correta apenas somente quando a proteína já se encontra purificada.

A confirmação da identidade das bandas foi realizada por meio do teste de “Western blot” utilizando anticorpo anti-histidina. Para tanto, as proteínas foram devidamente dosadas, utilizando-se uma curva de BSA, e foram feitos 2 géis de poliacrilamida com quantidades conhecidas das quatro proteínas NS1. Para o gel que foi corado com Coomassie foi aplicado cerca de 2,5 μg de cada proteína e no gel que foi submetido a transferência, para ensaio de “Western blot”, foi aplicado cerca de 1 μg de cada proteína (figuras 3).

Figura 3 - Em A: Perfil eletroforético em matriz de gel 15% SDS-PAGE das expressões das NS1.PM: Padrão de Peso Molecular (Colorplus); 1 a 4: Expressões das proteínas NS1 dos 4 sorotipos do vírus da Dengue. Em B: “Western blot” das expressões das proteínas NS1.PM: Padrão de Peso Molecular (Colorplus); 1 a 4: Expressões das proteínas NS1 dos 4 sorotipos do vírus da Dengue.



Os resultados do ensaio de “Western blot” permitiram observar a produção das 4 proteínas, pois houve reconhecimento da banda correta pelo anticorpo anti-histidina. Ressalta-se que é característico do vetor utilizado a inserção de uma etiqueta correspondente a 6 histidinas na porção N-terminal da proteína. A presença da etiqueta é fundamental para garantir o processo de purificação em coluna de níquel.

O princípio dessa purificação baseia-se no fato da histidina ter uma forte afinidade pelo níquel ativado, de maneira que quando a proteína a ser purificada é colocada em contato com a resina de níquel, ocorre sua ligação à coluna por afinidade. Durante o processo, são

utilizados diferentes tampões com diferentes concentrações de Imidazol (reagente que tem uma afinidade ainda maior pelo níquel ativado do que a histidina). Assim, à medida que a concentração de Imidazol é aumentada (nos processos de lavagem, por exemplo), as ligações fracas da histidina com o níquel vão se desfazendo e as proteínas vão sendo deslocadas da coluna. Por fim, no tampão de eluição (D), a quantidade de Imidazol é muito alta, e só então é capaz de fazer com que a proteína de interesse (com resíduos de 6 histidinas sequenciais) seja finalmente desligada do níquel e eluída.

4. CONCLUSÃO

Os antígenos e anticorpos testados apresentaram resultados satisfatórios para o reconhecimento do antígeno (NS1) ao seu correspondente anticorpo monoclonal, sem reação cruzada aparente quando utilizado amostra negativa para Dengue.

Todos os insumos desenvolvidos nesta pesquisa serão utilizados para o desenvolvimento de um teste rápido capaz de detectar os quatro sorotipos de dengue, com tecnologia 100% nacional.

5. REFERÊNCIAS

ARNOLD, F. H. How Proteins Adapt: Lessons from Directed Evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, v. 74, p. 41-46, 2009.

BURKE, D. S., MONATH, T. P. Flaviviruses, in Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1043-1125, 2001.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *AnnuRev Microbiol.*, v. 44, p. 649-688, 1990.

COSTA, S. M. et al. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine*, v. 24 (21), p. 4562-4564, 2006.

DUSSART, P. et al. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13 (11), p. 1185–1189, 2006.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of Proteins. 2a edição, 1990.

KOCHEL, T. J. et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*, v. 18 (27), p. 3166-3173, 2000.

KOPITO, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, v. 10 (12), p. 524-530, 2000.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication, in Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 991-1041, 2001.

MACIEL, I. O. et al. Electron and phonon renormalization near charged defects in carbon nanotubes. *Nature Materials, London*, v. 7, p. 878-883, 2008.

MARTINA, B. E. E., KORAKA, P., OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue vírus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22(4), p. 564-581, 2009.

PERERA, R., KUHN, R. J. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol.*, v. 11(4), p. 369–377, 2008.

RICE, C. M., et al., Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, v. 229(4715), p. 726-733, 1985.

RODHAIN, F., ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Wallingford: CAB International, 1997.

RUDOLPH, R., LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal*, v. 10(1), p. 49-56, 1996.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. Nature reviews. Microbiology, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WHO (World Health Organization), Fact Sheet 117,2014.Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>.Acessado em 09 de janeiro de 2015.

CAPÍTULO VIII

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS EM FORMULAÇÕES VACINAIS

Daniella Silva Bezerra¹

Diego Rodrigues Cravo Teixeira²

César Augusto Souza de Andrade³

Marina Galdino da Rocha Pitta²

Maria Danielly Lima de Oliveira³

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Departamento de Bioquímica, UFPE

E-mail de contato:bezerrads@gmail.com

RESUMO – *A vacinação é um dos métodos mais importantes e eficientes na prevenção de doenças infecciosas. No entanto, a medicina vivencia um grande desafio para ampliar o alcance e a eficácia das vacinas. Proteínas de superfície purificadas são exemplos de imunógenos de subunidades utilizados como vacinas. As proteínas são estruturas complexas que devem manter a*

integridade estrutural e química para funcionar corretamente. Métodos de fabricação podem comprometer sua estrutura expondo as proteínas a condições prejudiciais, tais como: temperaturas elevadas e agitação vigorosa. Dessa forma, o presente trabalho visou fornecer informações sobre a estabilidade física e química de proteínas em formulações vacinais mostrando como manter sua integridade, a fim de garantir a estabilidade do sistema vacinal. Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a estabilidade física e química de proteínas terapêuticas em formulações vacinais.

Palavras chave: Vacinas; Vacinas Protéicas; Adjuvantes vacinais.

1. INTRODUÇÃO

A vacinação é um dos métodos mais importantes e eficientes de prevenção de doenças infecciosas. No entanto, a medicina vivencia um grande desafio para ampliar o alcance e a eficácia das vacinas (FU et al., 2000).

As vacinas de agentes atenuados são capazes de induzir imunidade forte e duradoura. No entanto, existe o risco de reversão das estirpes virulentas que podem provocar doenças especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (LILJEQVIST; STAHL, 1999). As vacinas de agentes inativados, são menos protetoras em relação a indução da imunidade (COX, 2012).

Polissacarídeos bacterianos e virais, proteínas de superfície purificadas a partir de organismos patogênicos e toxinas, são exemplos de imunógenos de subunidades utilizados e investigados como vacinas ou componentes de vacinas (COX, 2012).

A estabilidade da estrutura secundária, terciária e quaternária de proteínas são baseadas em interações fracas não covalentes (interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas). O rompimento de uma dessas interações mudará o equilíbrio e desestabiliza a proteína.

Já a estabilidade química e física é comprometida por fatores ambientais como pH, força iônica, temperatura, alta pressão, solventes não-aquosos, íons metálicos, detergentes, produtos de adsorção, agitação e cisalhamento, que consiste na deformação que ocorre quando as forças atuantes sobre um corpo provoca deslocamento em diferentes planos, mantendo o volume constante. A maioria destes fatores está presente nos processos de fabricação, incluindo a esterilização e liofilização, que podem danificar as proteínas, reduzindo sua atividade biológica, induzindo a agregação e em última instância, a precipitação (ALMEIDA & SOUTO, 2007).

A estabilidade e a desnaturação de proteínas são temas de grande interesse fisiológico, terapêutico e biotecnológico, onde o controle da sua estabilidade representa uma importante estratégia para manutenção da atividade biológica. Dessa forma, o presente trabalho

procura se inserir neste contexto, fazendo uma revisão bibliográfica a fim de fornecer uma visão geral sobre a estabilidade física e química de proteínas em formulações vacinais mostrando a natureza complexa desses processos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada revisão da literatura nacional e internacional, a partir de 1999, utilizando os bancos de dados SCIELO e PUBMED. A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais, artigos de revisão, editoriais, diretrizes escritos na língua inglesa e portuguesa e livros sobre o assunto.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Proteínas

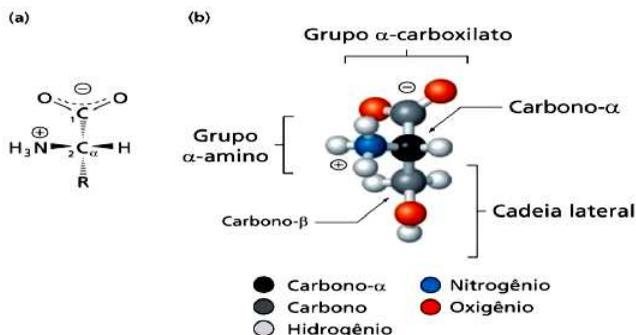
As proteínas participam essencialmente de todos os processos dentro das células. Algumas proteínas são componentes estruturais importantes, enquanto outras são catalizadores específicos, denominados enzimas, que promovem reações químicas. São polímeros formados por uma seleção de 20 elementos de construção, chamados aminoácidos. As propriedades funcionais das proteínas, assim como de outras biomoléculas, são determinadas por suas estruturas tridimensionais. Elas possuem uma importante propriedade: enovelam-se espontaneamente em

uma estrutura tridimensional definida e elaborada, que é formada inteiramente pela sequência de aminoácidos ao longo de suas cadeias (HORTON et al., 2013).

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. Um α -aminoácido é constituído de um átomo central de carbono, chamado carbono α ligado a um grupo amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupo R diferenciado, referido como uma cadeia lateral. Com quatro grupos diferentes conectados ao átomo de carbono α tetraédrico, os α -aminoácidos são quirais; as duas formas em imagem especular são chamadas de isômero L e isômero D (STRYER, 2004). As proteínas são constituídas de aminoácidos L (figura 1).

Os aminoácidos em solução e em pH neutro estão predominantemente na forma dipolar, a amina é protonada ($-\text{NH}^{3+}$) e a carboxila é desprotonada ($-\text{COO}^-$). O estado de ionização de um aminoácido varia com o pH, em solução ácida (exemplo pH 1), a amina está protonada ($-\text{NH}^{3+}$) e a carboxila sem dissociação ($-\text{COOH}$). À medida que o pH é elevado, o ácido carboxílico é o primeiro grupo a perder um próton. A forma dipolar persiste até o pH se aproximar de 9, quando a amina protonada perde um próton (STRYER, 2004).

Figura 2 - Representações de um L-aminoácido em pH neutro. (a) estrutura geral do aminoácido. (b) modelo de esfera e bastão da serina.



Fonte: Moran, Horton, Scringour, Perry (2013).

Vinte tipos de cadeias laterais, variando em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e reatividade química, são comumente encontrados em proteínas. A gama de funções exercidas por elas resulta da diversidade e da versatilidade desses 20 tipos de precursores. Entre o conjunto de aminoácidos, o mais simples é a glicina, que só tem um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral, sendo, dessa forma, o único aminoácido aquiral. A alanina é o segundo aminoácido mais simples, tem um grupamento metila ($-\text{CH}_3$) como cadeia lateral (STRYER, 2004).

Cadeias laterais compostas por hidrocarbonetos maiores são encontradas nos aminoácidos valina, leucina e interleucina. A metionina contém uma cadeia predominantemente alifática que inclui um grupamento tioéter ($-\text{S}-$). As cadeias laterais alifáticas maiores são

hidrófobas de maneira que tendem a se aglomerar para evitar o contato com a água (HORTON et al., 2013).

Os diferentes tamanhos e formas dessas cadeias laterais hidrocarbonadas permitem que elas se encaixem formando estruturas compactas com poucos espaços vazios. O aminoácido prolina também tem uma cadeia lateral alifática, mas difere dos outros membros do conjunto dos vinte por sua cadeia lateral ser ligada tanto ao nitrogênio quanto ao átomo de carbono α . Ela influencia a arquitetura das proteínas, pois sua estrutura em anel faz com que ela tenha maior restrição de conformação do que os outros aminoácidos. Três aminoácidos com cadeias laterais aromáticas fazem parte do repertório fundamental: a fenilalanina, contém um anel fenila ligado no lugar de um dos hidrogênios da alanina, a tirosina, contém uma hidroxila ligada ao anel aromático, o triptofano, contém um anel indólico ligado a um grupamento metileno (-CH₂-) (HORTON et al., 2013).

Dois aminoácidos, serina e treonina, contêm hidroxilas alifáticas tornando-as bastante hidrófilas e reativas. A cisteína é estruturalmente semelhante à serina, mas contém uma sulfidrina, ou um tiol (-SH), no lugar da hidroxila (-OH). A sulfidrina é muito reativa uma vez que podem se unir formando pontes dissulfeto, que são particularmente importantes na estabilidade de algumas proteínas. A lisina e a arginina são aminoácidos de cadeias laterais longas, que terminam em grupamentos que têm cargas positivas em pH neutro. Lisina termina em uma amina primária, e arginina em um grupamento

guanidina. A histidina contém um grupamento imidazol, um anel aromático que também pode ter carga positiva (STRYER, 2004).

As moléculas individuais de proteínas têm até quatro níveis estruturais. A estrutura primária descreve a sequência linear de resíduos de aminoácidos em uma proteína. A estrutura tridimensional é descrita por três níveis adicionais, as estruturas secundária, terciária e quaternária. As forças responsáveis por manter ou estabilizar esses três níveis são, principalmente, forças não covalentes (HORTON et al., 2013).

A estrutura secundária se refere às regularidades em conformações locais, mantidas por ligações de hidrogênio entre átomos de hidrogênio de amida e oxigênios carbonílicos da estrutura peptídica. As principais estruturas secundárias são as α -hélices, as fitas β e as voltas. A estrutura terciária descreve a cadeia polipeptídica completamente enovelada e compactada. Muitos polipeptídeos enovelados são compostos de várias unidades protéicas distintas ligadas por um trecho curto de resíduos de aminoácidos. Algumas proteínas têm estrutura quaternária formada pela associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas em uma proteína oligomérica ou de múltiplas subunidades (HORTON et al., 2013).

3.2 Vacinas

As vacinas são formulações biológicas ou bioquímicas capazes de estimular uma resposta imunológica protetora quando administradas em recipientes vacinais com o objetivo de prevenir uma

doença causada por um agente infeccioso (COSTA; COSTA, 2009). A existência de uma resposta de memória, portanto, serve como base para a construção de vacinas de importância profilática e terapêutica (JAIN et al., 2015).

O desenvolvimento pioneiro da vacina contra a varíola, feito pelo médico inglês Edward Jenner no século XVIII, e a introdução do conceito de “vacinação” por Louis Pasteur no século XIX marcaram o início de uma nova era para a medicina e incluíam o isolamento do agente infeccioso, a sua inativação e a inoculação do microrganismo inativado em animais de experimentação, em última instância, no indivíduo recipiente da vacina (BRAZ et al., 2014).

Esses princípios formaram as bases do desenvolvimento de vacinas por todo o século 20 de modo que todas as vacinas até então desenvolvidas, tinham como base o uso de microrganismos vivos atenuados, inativados, ou ainda subunidades obtidas de microrganismos como toxinas inativadas quimicamente, proteínas ou polissacarídeos purificados e, mais tarde, polissacarídeos conjugados a proteínas (COSTA; COSTA, 2009).

3.3 Classificação

A história das vacinas e sua aplicação na prevenção de doenças infecciosas iniciaram a mais de 200 anos. Desde as primeiras vacinas baseadas em patógenos, sejam eles bactérias ou vírus, atenuados ou inativados, muito reativos e, em alguns casos, pouco

eficientes, a pesquisa vacinal moveu-se na direção de empregar frações cada vez menores desses patógenos na busca de aumentar a segurança sem comprometer a eficácia. Dessa maneira, é comum classificar as vacinas em três grandes grupos em razão das estratégias ou dos conceitos utilizados na preparação do princípio ativo, os antígenos vacinais (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As primeiras vacinas representam aquelas que empregam na sua composição microrganismos vivos atenuados na sua constituição completa, mas submetido a tratamentos que levam à inativação, como a vacina BCG contra a tuberculose ou à atenuação dos microrganismos, como a vacina contra a *Bordetellapertussis* (BRAZ et al., 2014).

O segundo grupo de vacinas surgiu com a concepção de que, em alguns patógenos, a proteção vacinal pode ser obtida após a indução de anticorpos voltados para um único alvo, como uma toxina, responsável pelos sintomas da doença, ou açúcares de superfície que permitem ao sistema imune do hospedeiro neutralizar e eliminar bactérias (DINIZ; FERREIRA, 2010). Este grupo emprega as toxinas inativadas (toxinas purificadas e inativadas por tratamento químico), como no caso das vacinas antitetânica e antidiftérica. Outras vacinas empregam componentes de superfície purificados, como os polissacarídeos do *Hemophilus influenzae* tipo B e do Meningococo.

Por fim, o terceiro e mais recente grupo são as vacinas de DNA ou gênicas que utilizam a informação

genética do patógeno que codifica antígenos potencialmente imunizantes e é carregado por plasmídeos de DNA. Essas vacinas demonstram maior facilidade no controle de qualidade, estabilidade à temperatura ambiente e a manipulação, aspectos estes que facilitam a utilização das mesmas em campanhas de vacinação (BRAZ et al., 2014).

3.4 Vacinas protéicas

A aplicação das proteínas e peptídeos, como moléculas terapêuticas, é de grande importância para o tratamento de várias doenças devido às altas especificidade e atividade que apresentam em concentrações relativamente pequenas, quando comparadas aos fármacos (MELO et al., 2012).

Em uma fase inicial, a utilização de proteínas purificadas a partir de vírus ou bactérias era limitada a situações onde era possível cultivar e purificar antígenos específicos, como algumas toxinas, ou obtê-los a partir do soro de pacientes infectados, como no caso do vírus da hepatite B (BRAZ et al., 2014). A biotecnologia possibilitou a identificação dos determinantes antigênicos em microrganismos importantes na indução da proteção e o isolamento destes pela tecnologia do DNA recombinante assegurando que peptídeos sintéticos sejam produzidos em grande quantidade e usados como vacina.

A produção de proteínas tem sido amplamente explorada para a produção de antígenos virais e parasitários e, mais recentemente, essas vacinas têm sido comercializadas demonstrando o potencial comercial em

tecnologia de fabricação (COX, 2015). Essa produção ocorre quando o gene precisa ser clonado e inserido em sistemas de expressão heteróloga, por exemplo, células bacterianas, leveduras, células de mamíferos e de insetos, a fim de que estas secretem grandes quantidades desses antígenos (BRAZ et al., 2014). As células de insetos têm a capacidade de realizar muitas das modificações pós-translacionais tais como glicosilação, formação de ligações dissulfeto e a fosforilação necessárias para a atividade biológica de muitas proteínas complexas (COX, 2015).

Antígenos de proteínas representam uma alternativa muito promissora para o desenvolvimento de vacinas, devido às seguintes características: 1) a ausência de materiais infecciosos como genes que a codificam, 2) a capacidade de indução de anticorpos específicos para o antígeno, 3) possibilidade de modificação química e 4) a prontidão para a grande escala de produção para uma pandemia iminente (WANG et al., 2015). No entanto, a maioria dos antígenos baseados em proteínas tem a limitação da instabilidade fisiológica e baixa imunogenicidade, que exigem imunoestimulantes potentes e sistemas de distribuição eficientes a fim de produzir vacinas eficazes.

Apesar dos avanços biotecnológicos, a utilização de peptídeos e proteínas em vacinas constitui um desafio em virtude de serem instáveis, hidrofílicas, apresentar elevada massa molecular, estrutura complexa e baixa permeabilidade. Além das limitações encontradas na absorção, os peptídeos e proteínas geralmente apresentam

meia-vida curta, devido à degradação enzimática no local de administração ou durante o seu percurso para o local de ação (MELO et al., 2012).

Diversas estratégias podem ser avaliadas a fim de minimizar a proteólise. Entre as estratégias recombinantes empregadas para simplificar a produção de vacinas de proteína de subunidades estão: (I) síntese do fragmento do gene a ser expresso; (II) a produção de apenas subfragmentos imunodominantes de um imunógeno alvo; (III) a utilização de proteínas de fusão para melhorar a imunogenicidade; (IV) a engenharia de proteínas para melhorar a solubilidade e estabilidade; e (V) imunógenos de subunidades recombinantes pode ser adaptado para incorporação direta do adjuvante (LILJEQVIST; STAHL, 1999).

3.5 Adjuvantes Vacinais

Os adjuvantes são quaisquer substâncias que, incorporadas a uma formulação de vacina, atuam para acelerar, prolongar ou ainda aumentar a qualidade e a especificidade da resposta imunológica a um determinado antígeno (BRAZ et al, 2014). Como tal, representam importantes componentes da maioria das vacinas bem-sucedidas, particularmente aqueles com base em subunidades de agentes patogênicos, incluindo as frações isoladas dos agentes patogênicos mortos ou antígenos recombinantes (O'HAGAN; VALIANT, 2003).

No entanto, em razão do grande interesse pelos mecanismos da imunidade inata, pelos detalhes do

processamento e apresentação de antígenos, são necessárias definições mais sofisticadas de adjuvantes. Por isso, houve a preocupação em separar os adjuvantes tradicionais e inovadores em duas categorias (potencializadores do sistema imunológico e do sistema de distribuição) com base no seu mecanismo de ação dominante. Enquanto os sistemas de entrega agem principalmente localizando os componentes da vacina para atingir as APCs, os potencializadores do sistema imunológico ativam diretamente estas células através de receptores específicos (por exemplo, tipo Toll ou TLRs). Assim, os sistemas de distribuição são usados para promover a interação de ambos os antígenos e potencializadores do sistema imunológico com as células chave do sistema imune inato (O'HAGAN; VALIANT, 2003).

As vantagens potenciais dos adjuvantes vacinais incluem o aumento da imunogenicidade de antígenos fracos, a redução da quantidade de antígeno e do número de imunizações necessárias para se conferir a proteção adequada (BRAZ et al., 2014).

3.6 Mecanismos de Degradação da Vacina

Um desafio importante no desenvolvimento da formulação de vacinas é identificar o mecanismo de degradação responsável pela instabilidade de cada componente na formulação a fim de garantir a estabilidade do sistema vacinal. Em vacinas e em produtos farmacêuticos tradicionais, dois mecanismos básicos de degradação são, em grande parte, responsáveis

pela instabilidade do produto: degradação química e física (HASIJA et al., 2013).

A Degradação química envolve qualquer tipo de processo que leva a uma ruptura ou formação de novas ligações covalentes gerando novas espécies químicas. Alternativamente, a degradação física envolve alteração do estado físico dos componentes da vacina, tais como agregação, transição de fase ou desnaturação, sem alteração da composição química (HASIJA et al., 2013).

A degradação química mais comum em proteínas e peptídeos é a desaminação. Esta ocorre quando um grupo amina é removido das cadeias laterais da asparagina (Asn) e da glutamina (Gln). Em alguns casos, a desaminação pode resultar na redução da atividade biológica, enquanto que em outros, a função biológica não é alterada. Existem relatórios indicando a desaminação como causa do aumento da imunogenicidade das proteínas terapêuticas, no entanto não há relatos de tais mudanças no campo das vacinas (HASIJA et al., 2013).

A transferência de dissulfetos pode ser observada em proteínas sob condições de pH neutro e alcalino e pode ser acelerada por tióis. Esta reação pode levar a estrutura alterada, instabilidade conformacional e, em última análise, a antigenicidade alterada de antígenos protéicos. A formação incorreta de dissulfetos em proteínas liofilizadas podem resultar em agregação e alterações conformacionais (HASIJA et al., 2013).

Resíduos de Cys em proteínas podem reagir com espécies reativas do oxigênio (ROS) por reação de oxidação para formar ligações dissulfeto intra ou intermoleculares. Outros subprodutos monomoleculares tais como ácidos ou sulfenilocistéico, podem ser originados como resultado das mais severas condições de oxidação (FU et al., 2015).

A instabilidade ao calor de vacinas proteicas é controlada pelo uso quase universal da refrigeração no transporte e armazenamento, porém, a proteção contra danos causados por temperaturas de congelamento tornou-se uma consideração igualmente importante. A reduzida eficácia da vacina em virtude à exposição a temperaturas de congelamento, pode ser atribuído a instabilidade do antígeno e do adjuvante. Vários mecanismos têm sido propostos para a aglomeração do adjuvante exposto a baixas temperaturas. Estes incluem a superação das forças de repulsão entre as partículas carregadas, criadas pelo aparecimento de cristais de gelo, e alteração da química da superfície das partículas através do congelamento, além da troca iônica de sais de tampão usados como adjuvantes (CLAPP et al., 2011).

As proteínas são expostas a várias tensões durante o processo de fabricação, incluindo variações de temperatura, agitação vigorosa e exposição a solventes orgânicos ou ambientes ácidos. Além dos métodos de fabricação, as proteínas são também susceptíveis às condições biológicas extremas (por exemplo, o pH gástrico) podendo ocasionar sua desnaturação e/ou degradação, reduzindo a atividade biológica e

imunogenicidade, bem como gerando efeitos adversos (JAIN et al., 2015).

3.7 Estabilidade de Proteínas em Formulações Vacinais

A compreensão dos problemas de estabilidade das proteínas é necessária para criar formulações clinicamente viáveis de maneira a manter a integridade da proteína e os fatores que afetam toda a vida útil do produto.

Durante o processamento e formulação da vacina, a proteína é exposta a condições que podem ter efeitos significativos sobre a sua estabilidade química e física que levam à agregação e, finalmente, a precipitação (FU et al., 2015). Por isso, é importante compreender as circunstâncias pelas quais a estabilidade da proteína é comprometida.

A identificação das causas e dos mecanismos moleculares de inativação da proteína de interesse é fundamental para ultrapassar as vias degradativas. Com base nesse conhecimento, estratégias de processamento e de formulação são exploradas com o propósito de impedi-los (FU et al., 2015).

Pequenas, proteínas de domínio único geralmente exigem condições extremas para desdobrar, mas para grandes proteínas, de vários domínios, condições relativamente delicadas podem ser suficientes para iniciar a agregação. Estados parcialmente desdobrados são muito mais suscetíveis à agregação do que o estado nativo, devido à exposição de regiões hidrofóbicas

contíguas que estão embutidas no estado nativo ou ausente no estado desnaturado (FROKJAER; OTZEN, 2015).

Middaugh et al (2007) investigaram o dobramento da cadeia recombinante de ricina A e duas variantes genéticas criadas como vacinas potenciais. Neste caso, uma proteína mais termoestável foi feita através da remoção de resíduos do domínio C-terminal que contribuíram para a adoção de um estado parcialmente dobrado, assim como eliminou a atividade enzimática tóxica através da remoção de resíduos cruciais para a ligação com o substrato. Outra melhoria para a construção de versões de domínio único, não possuindo o domínio C-terminal, foi realizado através da remoção de um loop protease sensível.

Formulações estratégicas incluem a utilização de excipientes ou modificação de proteínas para reduzir as reações químicas prejudiciais, tais como desaminação ou de permuta de dissulfeto (FU et al., 2015). Os excipientes têm demonstrado serem eficaz na proteção de proteínas após a administração, presumivelmente por "congelar" a conformação da proteína e, assim, reduzir a sua propensão para sofrer reações deletérias (FROKJAER; OTZEN, 2015).

Uma abordagem para melhorar a estabilidade térmica de vacinas é a utilização de adjuvantes contendo alumínio combinados com tampões, pois são responsáveis por controlar o estado de ionização das

cadeias laterais dos aminoácidos do antígeno (CLAPP et al., 2011).

Middaugh et al., (2007) melhoraram a estabilidade térmica de vacinas através de pesquisa de diagrama de fase empírico, onde o antígeno é caracterizado através de técnicas biofísicas sob diferentes condições, tais como pH, temperatura e força iônica, com a finalidade de definir as condições de formulação ideais para manter as propriedades estruturais pretendidas. A partir dos resultados destes estudos, foi possível concluir que os adjuvantes contendo alumínio de fato resultaram em formulações com aumento da estabilidade térmica do antígeno no estado adsorvido.

Formulações vacinais contendo excipientes como o propilenoglicol com o tampão de fosfato-histidina em vacinas da hepatite B atingiram estabilidade realçada quando exposta ao calor e ao congelamento (24). Outra estratégia para controlar problemas de estabilidade é o uso de adjuvante contendo alumínio em formulação de vacinas na forma de pó seco (CLAPP et al., 2011).

Um método para a produção de formulações biológicas secas envolve a utilização de fluidos supercríticos. Este processo foi usado para produzir uma vacina com o antígeno da hepatite B contendo adjuvante de hidróxido de alumínio seco. Após a reconstituição, a vacina apresentou pouca perda detectável em potência ou imunogenicidade em ratos (CLAPP et al., 2011).

Os métodos de secagem requerem aquecimento ou congelamento, os quais podem ser problemáticos para

os componentes da vacina, pois, é necessário um passo adicional da reconstituição antes da administração, ocasionando uma fonte adicional de erro e outra condição de estresse durante a preparação (SIEVERS et al., 2007).

Sievers et al., (2007) relataram que a formulação em pó era estável após o armazenamento a 66°C (até 10 dias) e - 20°C (até 43 dias). O método também tem sido utilizado para produzir uma formulação em pó inalável de vacina viva atenuada contra sarampo. Similar aos métodos de secagem por congelamento, a maioria destas formulações requerem um ou mais adjuvantes, geralmente tenso ativo ou açúcares.

Wang et al., (2015) relataram que proteínas de ovalbuminas incubadas mantiveram a sua estrutura, com poucas diferenças nas estruturas primárias, secundárias e terciárias, quando aprisionadas em matrizes de hidrogel. Essas proteínas apresentaram menos dispostas a desnaturação e agregação nas matrizes devido ao elevado teor de água, e manteve uma alta antigenicidade em todos os casos estudados.

Vacinas baseadas em partículas semelhantes a vírus (VLP), que são formas oligoméricas de proteínas recombinantes, representam uma alternativa segura e eficaz. As VLPs oferecem respostas imunes superiores, presumivelmente devido à presença de múltiplos epítomos que simulam a superfície do vírus. No entanto, a eficácia destas vacinas pode ser melhorada pela presença de adjuvantes, por exemplo, as vacinas de VLP contra HPV desenvolvidas pela Merck e GSK incluem o

adjuvante de alumínio na sua formulação (WANG et al., 2015).

4. CONCLUSÃO

O conhecimento da estabilidade física e química das proteínas para o desenvolvimento de formulações vacinais é crucial para a manutenção da sua conformação nativa em todas as fases de fabricação, armazenamento e administração, a fim de obter uma vacina bem sucedida.

Estratégias para formulação de vacinas protéicas são necessárias para estabilizar estas moléculas, relativamente frágeis, contra tensões químicas e físicas encontradas durante o desenvolvimento. Estes requisitos são abordados através da incorporação de uma combinação seletiva de diferentes classes de excipientes, de maneira que seus efeitos sobre a estabilidade e a potência do produto sejam monitorizados.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. J., SOUTO, E. Solidlipidnanoparticles as adrug delivery system for peptidesandproteins. *Adv.Drug.Deliv. Rev.*, v. 59(6), p. 478-490, 2007.

BRAZ, L.C.C., GUIMARÃES, D.T., VAZ, M.R.F., NÓBREGA, F.F.F. Contribuições da Biotecnologia no Desenvolvimento e Produção de Vacinas de Primeira,

Segunda e Terceira Gerações. *Revista Saúde e Ciência On Line*, v. 3(3), p. 189-206, 2014.

CLAPP, T., SIEBERT, P., CHEN, D., BRAUN, L. J. Vaccines with Aluminum-containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 100(2), p. 388-401, 2011.

COSTA, M. A. F., COSTA, M. F. B. Biossegurança de OGM: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Publit, 2009.

COX, M. M. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, v. 30(10), p. 1759-1766, 2012.

DINIZ, M. O., FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 24(70), p. 19-30, 2010.

FROKJAER, S., OTZEN, D. E. Protein Drug Stability: A Formulation Challenge. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 4, p. 298-306, 2005.

FU, K., KLIBANOV, A. M., LANGER, R. Protein stability in controlled-release systems. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 24-25, 2000.

HASIJA, M., LI, L., RAHMAN, N., AUSAR, S. F. Forced degradation studies: an essential tool for the formulation development of vaccines. *Vaccine: Development and Therapy*, v. 3, p. 11-33, 2013.

HORTON, R. H., MORAN, L. A., SCRIMGEOUR K. G., PERRY, M. D., RAWN, J.JAIN, N. K., SAHNI, N., KUMRU, O. S., JOSHI, S. B., VOLKIN, D. B., MIDDLEAUGH, C. R. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-likeparticle vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 1-15, 2014.

LILJEQVIST, S., STAHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.*, v. 73(1), p. 1-33, 1999.

MELO, C. S., CUNHA JUNIOR, A. S., FIALHO, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada*, Belo Horizonte, v. 33(4), p. 469-477,2012.

O'HAGAN, T. D., VALIANTE N. M. Recent Advances In The Discovery And Delivery Of Vaccine Adjuvants. *Nature reviews / Drug Discovery*. v. 2. p. 727-735, 2003.

SIEVERS, R.E., QUINN, B.P., CAPE, S.P., SEARLES, J.A., BRAUN, C.S., BHAGWAT, P., REBITS, L.G., MCADAMS, D.H., BURGER, J.L., BEST, J.A., LINDSAY, L., HERNANDEZ, M.T., KISICH, K.O., IACOVANGELO, T., CHEN, D.K.D. Near-critical fluid micronization of stabilized vaccines, antibiotics and anti-virals. *J SupercritFluids*,v. 42, p. 385–391, 2007.

STRYER, L. Bioquímica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

WANG, S., LIU, H., ZHANG, X., QIAN, F. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. *Protein & Cell*, v. 6(7), p. 480-503, 2015.

CAPÍTULO IX

USO DE AGENTES SANITIZANTES NA INDÚSTRIA DE BIOTECNOLOGIA

Ellison Neves de Lima¹

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: ellison.lima@ufpe.br

RESUMO – *A etapa produtiva do processo de sanitização é um campo que envolve desafios no desenvolvimento e implementação. O conhecimento dos diversos tipos de produtos envolvidos neste processo é feito com base na característica dos valores de pH apresentados, para a remoção ideal da sujidade. As soluções para sanitização podem ser constituídas da associação de materiais que irão caracterizar o seu poder de remoção da sujidade. Assim como imposto pelo órgão regulador, para a indústria farmacêutica esse processo deve ser documentado e validado. Sendo possível observar que a sanitização, quando comparada*

com a produção usual de medicamentos, não se diferem. Entretanto, ela é crucial para a segurança e eficácia do produto.

Palavras chave: indústria biofarmacêutica, vacinas, boas práticas de fabricação, validação de limpeza.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que os processos de biotecnologia industrial são envoltos por várias etapas. O processo de “downstream” é responsável pela produção de moléculas biológicas, como por exemplo, anticorpos monoclonais, para uso clínico, comercial ou de pesquisa (COX; COULTER, 1997). A concepção e implementação de protocolos de limpeza adequada são parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF) que garantam a produção e controle das condições para produção das biomoléculas (BRASIL,2010).

Para muitos processos biológicos, nem todas as interações químicas ou físicas dos componentes com os materiais são compreendidas ou definidas. Um exemplo deste processo de desafio desconhecido pode envolver proteínas hidrofóbicas aderirem às partes hidrofóbicas do equipamento (BANAT, 1995). Estes tipos de interações inespecíficas, junto com compatibilidade química, são critérios fundamentais que devem ser levados em consideração nos desenvolvimentos de protocolos de limpeza, incluindo a definição dos reagentes de limpeza, tempo de contato, temperatura, sequência de lavagem, enxágue, número de ciclos e expectativa do tempo de

vida dos materiais e equipamentos (SEIBERLING, 2008).

Como citado por LeBlanc (1993) limpeza é o primeiro passo na produção da próxima batelada e tem grande impacto na segurança e eficácia do produto. No protocolo de limpeza/sanitização para biorreatores, colunas de cromatografia, membranas, tanques e tubulações, a natureza das superfícies a serem limpas devem ser cuidadosamente avaliadas (CHISTI; MOO-YOUNG, 1994). Ao procurar a limpeza ideal ou agentes de sanitização, é possível encontrar uma seleção de excelentes reagentes de uso único, porém é fundamental entender o efeito que cada agente possui perante os equipamentos em termos de compatibilidade e longevidade (AARNISALO et al., 2000).

Sendo assim, o estudo teve como objetivo identificar os principais agentes de sanitização utilizados em processos biotecnológicos. Bem como, classificar e conceituar o modo de ação dos agentes de sanitização, além de definir seu modo de uso.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Levantamento bibliográficos de publicações atualizadas (artigos, dissertações, teses e livros), nos principais bancos de dados (PubMed; Scielo; Science Direct; Google Acadêmico). Palavras chaves utilizadas: indústria biofarmacêutica; vacinas; sanitização; boas práticas de fabricação; validação de limpeza.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos aspectos mais importantes na Garantia da Qualidade da Indústria Farmacêutica é a higiene, que tem como finalidade assegurar a qualidade sanitária final do produto (ARAÚJO; BORIN, 2012). A desinfecção dos equipamentos é importante para o controle de contaminação cruzada, evitar a formação de biofilmes e de outras não conformidades de origem bacteriana, durante a produção/fermentação (BREMER, et al., 2006; BHADORIYA et al., 2013).

O processo de higienização é dividido em duas etapas bem definidas: a limpeza e a sanitização. O objetivo primordial da limpeza é a remoção de resíduos orgânicos, tais como proteínas, minerais e lipídeos, enquanto a sanitização tem por objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis estabelecidos pelos órgãos sanitários (CONSTABLE et al., 2007).

No processo de limpeza, a adesão à superfície tem de ser contida, fornecendo forças que contrariem a adesão. Estas forças podem ser reduzidas pelos quatro parâmetros básicos de qualquer processo de limpeza. Esses parâmetros são: Tempo de limpeza; Temperatura da limpeza; Ação mecânica; Atividade química do agente de limpeza (SEIBERLING, 2008). Os quatro parâmetros básicos do processo de limpeza são todos dependentes uns dos outros. A redução ou o aumento de qualquer um desses componentes vai alterar o equilíbrio dos demais.

O desenvolvimento de um método de limpeza personalizado inicia-se com uma amostra obtida a partir do fabricante. Dependendo da informação dada, o teste de solubilidade seletiva será realizado sob condições padronizadas (temperatura, volume, agitação, etc.) utilizando soluções de limpeza alcalina, neutra e ácidas. O teste pode resultar em um processo de limpeza de fase única (pré-lavagem de limpeza a solução de pós-lavagem) ou uma de duas fases de limpeza (pré-lavagem-primeira limpeza solução de intermediário de lavagem de segunda limpeza solução de pós-lavagem) (LeBLANC et al., 1993; BREMER, 2006; DAS; MUKHERJEE; SEM, 2009). As soluções de limpeza podem conter uma, duas, ou mesmo em alguns casos três produtos de limpeza formuladas para conseguir o melhor resultado.

Os agentes de sanitização podem ser classificados pela sua aparência física ou pela sua finalidade de uso. No entanto, o método mais adequado para investigar a composição de produtos de limpeza industriais é começar com uma estrutura lógica que divide a limpeza em grupos dependendo do seu pH (SHARNEZ, 2011). A maioria dos produtos de limpeza industriais são alcalinos ou ácidos. Produtos neutros são utilizados principalmente para a limpeza manual, superfícies sensíveis ou como aditivos para produtos de limpeza alcalinos ou ácidos.

Sujeiras inorgânicas são mais solúveis em produtos ácidos do que em soluções alcalinas. No entanto, a escolha dos ácidos pode ser restringida por um número de razões, incluindo a corrosão do equipamento. A compatibilidade com outros componentes de limpeza e o

efeito sobre o meio ambiente, também deve ser considerado. Produtos de limpeza ácidos podem ser divididos em desincrustantes e produtos de limpeza acídicos (HOWARD;HOOD, 2005; BREWER, 2008).

Os desincrustantes ácidos servem o único propósito de remover escala inorgânica, como por exemplo, crostas de sais da água. Eles consistem essencialmente de um ou uma mistura de dois ácidos e um inibidor da corrosão, que se destinam a ser usadas em superfícies sensíveis a ácidos (BREWER, 2008). Encrustações inorgânicas aparecem frequentemente em combinação com encrustações orgânica sendo assim, seria vantajoso dispor de produtos de limpeza que possam lidar com ambos os tipos de sujidades. É possível formular produtos de limpeza acídicos, através da combinação de agentes tensoativos com ácidos selecionados.

Outro segmento de limpadores são os neutros, no qual significa muitas vezes um detergente suave num intervalo de pH de cerca de 6 (pele humana) a cerca de 10 (sabonete). A eficácia destes produtos de limpeza baseia-se na detergência de surfactantes suportados. Esse produto pode ser muito eficiente em relação a sanitização de produtos hidrofóbicos e gorduras mas, outras matérias orgânicas como proteínas, pode constituir um problema. Para superar este problema, existem produtos de limpeza que contêm enzimas neutras para lidar com proteínas e outros materiais orgânicos. Produtos de limpeza deste tipo são usados para limpar membranas sensíveis ao pH utilizados em processos de filtração de fluxo cruzado (CHIST; MOO-YOUNG, 1994; BREWER, 2008).

Por sua vez, os limpadores alcalinos tais como, hidróxido de sódio, podem reagir com grupos funcionais da matéria orgânica e converter a sujeira orgânica num composto solúvel em água ou alterar a natureza química ou física para que possa ser mais facilmente removido. Além disso, alguns compostos de limpeza mostram um aumento da eficácia num ambiente alcalino.

O hidróxido de sódio, especialmente quando se lida com resíduos orgânicos, é a escolha usual para a base de um agente de sanitização. Em alguns casos, especialmente quando a formulação de produtos alcalinos fortes que contenham outros componentes de limpeza em uma concentração elevada, é vantajosa a utilização de hidróxido de potássio. Hidróxido de potássio também melhora a estabilidade dos limpadores alcalinos (SEIBERLING, 2008; BHADORIYA, 2013).

Agora torna-se óbvio que uma boa limpeza tem de ser formulada de acordo com os requisitos do material a ser removidos. Um produto de limpeza industrial projetado para indústrias de laticínios ou de alimentos não seria a melhor escolha para a limpeza na indústria farmacêutica. Não é apenas o tipo de sujeira, mas também requisitos das indústrias farmacêuticas sobre a coerência de um produto, pureza, etc., que exigem uma gama de produtos exclusivamente dedicados para a limpeza de equipamentos de produção (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os processos de limpeza têm por objetivo que o próximo lote do produto, não seja contaminado a partir

de qualquer produto químico ou fonte microbiológica. Evitar a contaminação de um lote de produção se concentra principalmente na prevenção de transição de resíduos do produto a partir de um lote anterior. Isto é especialmente importante quando há mais de um tipo de produto sendo produzido no mesmo equipamento de processo. Para se chegar a níveis de resíduos nulos ou aceitáveis dependerá de fatores básicos como: escolha do detergente, cinética de limpeza, temperatura de solução e tempo de contato. Infelizmente, não há "fórmula matemática" e, na prática, depende muito de experiências anteriores e resultados de testes (KENDRICK, CANHOTO; KREUZE, 2009; HWANG, 2010).

Vários fatores devem ser considerados no desenvolvimento do processo de sanitização. Não são apenas eficácia e desempenho, mas também questões mais amplas, como a toxicidade do produto e os seus efeitos ambientais. Além disso, a indústria química concordou voluntariamente em renunciar à utilização de determinados produtos químicos (SINCLAIR et al., 2008).

Os próprios agentes de limpeza modernos são cada vez mais compatíveis com o meio ambiente, de modo que o uso desses produtos raramente provoca problemas específicos durante o tratamento de águas residuais. Fosfatos e nitratos são nutrientes para plantas como algas e, portanto, contribuem para a eutrofização das águas (FERARD; BLAISE, 2013). Eles podem, no entanto, através de determinados processos ser em grande parte removido em estações de tratamento de esgotos. Na

verdade, a quantidade dessas substâncias que entram no curso de água por meio de produtos químicos é mínimo quando comparado às descargas agrícolas e residenciais.

Tomando ciência dos diversos processos que se fazem presentes na produção industrial biotecnológica, seja ele produção de vacinas, biomoléculas ou outros derivados bacterianos ou celulares, a sanitização adequada é fundamental para assegurar a qualidade final de cada produto.

4. CONCLUSÃO

Através dos aspectos analisados e sempre observando os cuidados necessários para limpeza, conclui-se que a utilização dos agentes de sanitização disponíveis e utilizados na indústria biofarmacêutica não difere substancialmente dos utilizados na indústria farmacêutica / cosmética assim como, seus planos de validação e disposição de seus efluentes.

5. REFERÊNCIAS

AARNISALO, KAARINA et al. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, v. 20, n. 4, p. 237-250, 2000.

ARAÚJO, A. A. F.; BORIN, M. F. Influencia de excipientes farmacêuticos em reações adversas a

medicamentos. Brasília Med: artigo de revisão. v. 49, p.267-278, 2012.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial application of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. v. 53, p. 495-508, 2000.

BHADORIYA, S.S.; MADORIYA, N.; SHUKLA, K.; PARIHAR, M. S. Biosurfactants: A New Pharmaceutical Additive for Solubility Enhancement and Pharmaceutical Development. Biochemistry pharmacology. v. 2, p. 1-5, 2013.

BRASIL, RDC. de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, 17.

BREMER, PHILIP J.; FILLERY, SUZANNE; MCQUILLAN, A. JAMES. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International journal of food microbiology, v. 106, n. 3, p. 254-262, 2006.

BREWER, REBECCA. Cleaning Validation for the Pharmaceutical, Biopharmaceutical, Cosmetic, Nutraceutical, Medical Device, and Diagnostic Industries. Validation of Pharmaceutical Processes. 3rd ed. Carleton: Informa Healthcare USA, Inc, p. 491-519, 2008.

CHISTI, YUSUF; MOO-YOUNG, MURRAY. Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design,

validation and operation. *Journal of industrial microbiology*, v. 13, n. 4, p. 201-207, 1994.

CONSTABLE, DAVID JC et al. Key green chemistry research areas—a perspective from pharmaceutical manufacturers. *Green Chemistry*, v. 9, n. 5, p. 411-420, 2007.

COX, J.C.; COULTER, A. R. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. v. 15, p. 248-256, 1997.

DAS, P.; MUKHERJEE, S. SEM, R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 71, p. 183-186, 2009.

FÉRARD, J. F.; BLAISE, C. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Science: Metz, France, 2013.

HWANG, R.-C. How to establish an effective Maintenance program for cleaning validation. *Pharmaceutical technology*, v. 24, n. 4, p. 62-72, 2000.

HOWARD, JOHN A.; HOOD, ELIZABETH. Bioindustrial and biopharmaceutical products produced in plants. *Advances in agronomy*, v. 85, p. 91-124, 2005.

KENDRICK, KATHLEEN; CANHOTO, ALFREDO; KREUZE, MICHAEL. Analysis of degradation properties of Biopharmaceutical Active ingredients as Caused by various process Cleaning Agents and Temperature. *Journal of Validation Technology*, v. 15, n. 3, p. 69, 2009.

LeBLANC, D.A., DANFORTH, D.D., SMITH, J.M. Cleaning technologies for pharmaceutical manufacturing. Pharm Technol 1993; 17(10):118–24.

SEIBERLING, DALE A. (Ed.). Clean-in-place for Biopharmaceutical Processes. Informa healthcare, 2008.

SHARNEZ, RIZWAN; TO, ANGELA. New Perspectives on Cleaning. 2011.

SINCLAIR, ANDREW et al. The environmental impact of disposable technologies. BioPharmInt, v. 21, n. Suppl 11, p. S4-S11, 2008.

CAPÍTULO X

ABORDAGENS IMUNOBIOLOGICAS NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER

Gabriela Souto Vieira de Mello¹

Marina Ferraz Cordeiro²

Renata Virgínia Cavalcanti Santos²

Michelly Cristiny Pereira²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato:gabrielvanello@hotmail.com

RESUMO - *O câncer é caracterizado por mais de 100 tipos de doenças, e a evolução do conhecimento científico permitiu um maior esclarecimento sobre as vias carcinogênicas, ampliando conceitos antes baseados apenas na hiperproliferação celular, para conceitos mais complexos como a interação das células tumorais e o sistema imune. Esse novo olhar permitiu o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas através da estimulação da*

imunidade antitumoral. No microambiente tumoral existe uma conversa dinâmica entre as células neoplásicas e as células do sistema imune que podem favorecer ou inibir o crescimento tumoral e/ou metástase. Neste contexto, as imunoterapias têm como principal objetivo auxiliar o sistema imune na luta contra as células cancerígenas e atualmente a combinação de terapias convencionais associadas à imunoterapia têm se mostrado mais eficazes na erradicação e na diminuição da recidiva. Foi realizado um levantamento bibliográfico através dos bancos de dados PubMed, Scielo, Google Acadêmico e Science Direct, utilizando como palavras-chave: câncer, imunoterapia, vacinas, imunobiológicos e seus respectivos sinônimos em inglês, com o objetivo de investigar o estado da arte das principais imunoterapias aplicadas aos mais diversos tipos de neoplasias.

Palavras chave: Abordagens Terapêuticas; Neoplasias; Sistema Imune.

1. INTRODUÇÃO

Câncer é a segunda doença que mais mata no mundo, ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares. Esta doença é composta por um conjunto de alterações celulares que levam ao crescimento celular desordenado, causado por diversos fatores intrínsecos como mutações hereditárias ou extrínsecos como fatores ambientais e nutricionais (Instituto Nacional do Câncer, 2014).

No microambiente tumoral são encontradas diversas células do sistema imune como macrófagos e linfócitos e uma

gama de mediadores químicos inflamatórios. Apesar de as células neoplásicas expressarem proteínas estrutural ou quantitativamente diferentes das proteínas normais, na maioria das vezes elas conseguem driblar a ativação de uma resposta inflamatória eficiente para a sua eliminação e passam a utilizar o sistema imune ao seu favor (Quail & Joyce, 2013).

Baseados nestas interações, diversos estudos têm demonstrado que um fenótipo mais agressivo das células tumorais é diretamente dependente destas interações entre célula e microambiente tumoral. Assim, novos tratamentos têm sido desenvolvidos para permitir uma ativação imunológica mais efetiva capaz de erradicar e/ou aperfeiçoar os tratamentos convencionais para o câncer (Joyce & Fearon, 2015).

Várias terapias utilizam a manipulação da imunidade antitumoral, incluindo a imunização passiva por anticorpos monoclonais, a introdução de adjuvantes no microambiente tumoral e a administração de citocinas sistêmicas (Scott et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivos determinar o estado da arte das principais imunoterapias aplicadas no tratamento e prevenção do câncer e traçar um quadro teórico com base na literatura já publicada sobre a relação do desenvolvimento tumoral e o sistema imune destacando as principais abordagens terapêuticas de caráter imunológico aplicadas no controle e erradicação dos diversos tipos de câncer.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho desenvolvido teve caráter exploratório, através de uma pesquisa bibliográfica em livros, artigos científicos, teses e dissertações. Foram utilizados os bancos de dados PubMed, Scielo, Google Acadêmico e Science Direct, utilizando como palavras-chave: câncer, imunoterapia, indústria farmacêutica, vacinas, imunobiológicos e seus respectivos sinônimos em Inglês.

Foi realizada uma leitura inspeccional de todos os resumos do material selecionado de forma rápida e objetiva para a seleção dos textos que mereceram uma leitura mais atenta e profunda. Foram excluídos os trabalhos publicados em idiomas que não português, inglês ou espanhol. Após esta exploração, foi realizada uma avaliação crítica dos textos selecionados e estes foram organizados por ordem cronológica para permitir uma análise comparativa da evolução temporal sobre o tema.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos Gerais do Câncer

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012, cerca de 32,6 milhões de pessoas viviam com câncer, dentre os quais 8,2 milhões morreram dessa doença. Apesar de ser uma das principais patologias estudadas, em 2030 são esperados 75 milhões de pessoas acometidas e 17 milhões de óbitos por sua decorrência. No Brasil, o câncer de próstata

lidera o ranking de incidência em homens, excluindo o câncer de pele não-melanoma com uma média de 70,42 casos por 100.000 habitantes. Em mulheres, excluindo o câncer de pele não-melanoma, as maiores taxas de óbito e de incidência são causadas pelo câncer de mama, acometendo uma média de 56,06 casos a cada 100.000 habitantes (Datusus, 2015).

O câncer é caracterizado como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Essa doença tem como causas principais fatores externos, como a exposição a elementos carcinogênicos, e fatores internos como mutações, estando ambas inter-relacionadas (Sceneay et al., 2013; Instituto Nacional do Câncer, 2014; Print et al., 2014).

O desenvolvimento científico permitiu a elucidação do processo carcinogênico e, apesar de ser considerado heterogêneo no que se refere à etiologia e patogenia, algumas propriedades são comuns entre os diversos tipos de câncer, são elas: potencial proliferativo ilimitado, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, reprogramação do metabolismo energético, evasão da morte celular programada, manutenção da angiogênese, ativação da invasão e metástase, defeitos cromossômicos e instabilidade genômica, escape do sistema imune e inflamação. Essas propriedades resultam de uma interação complexa entre as células tumorais e as células presentes no microambiente tumoral como as células

mielóides, do sistema imune, endoteliais e fibroblastos (Hanahan & Weinberg, 2011).

3.2. Aspectos Imunológicos do Câncer

Os tumores são infiltrados por células do sistema imune inato e adaptativo, ativando condições inflamatórias. Cada lesão neoplásica contém células imunes presentes em uma densidade que varia de infiltrações sutis detectáveis apenas com anticorpos específicos até inflamações graves que são aparentes até mesmo por meio de técnicas de coloração histoquímica padrão (Page et al., 2010).

A presença do sistema imune tem grande influência no potencial neoplásico dos tumores, e de uma forma geral, novas células tumorais imunogênicas são combatidas pelo sistema imune e eliminadas. (Gajewski et al., 2013). Em contrapartida, a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento do tumor através do fornecimento de moléculas ativas, como fatores de crescimento, fatores pró-angiogênicos e enzimas modificadoras da matriz extracelular (Denardo et al., 2010). Em adição, as células inflamatórias presentes no microambiente tumoral podem secretar espécies reativas de oxigênio, as quais são capazes de causar mutações nas células neoplásicas, acelerando a evolução e a malignidade do tumor (Grivennikov et al., 2010).

Os macrófagos ativados pelo interferon- γ (INF- γ) participam da resposta inflamatória aguda em lesões iniciais e são responsáveis por eliminar as células tumorais através da secreção de espécies reativas de oxigênio; entretanto, quando ativados pelas interleucinas (IL) 4 e 13

passam a secretar grandes quantidades de IL 10, inibindo a ativação das células citotóxicas e favorecendo a progressão tumoral (Joyce, 2015). Assim como os macrófagos, os linfócitos T também atuam de forma ambígua na tumorigênese. Os linfócitos T CD4+ da via Th1 são responsáveis pela atuação antitumoral dos macrófagos através da secreção do INF- γ . Em contrapartida, as CD4+ da via Th2 secretam IL 4 e 13 e bloqueiam a resposta do tipo Th1 (Quail, 2013).

As células Th17 também têm funções contraditórias na cancerologia, reprimindo ou promovendo o crescimento tumoral dependendo da situação, ao liberar adenosina imunossupressora ou erradicando melanomas em camundongos, respectivamente (Wilke et al., 2011; Bailey et al 2014). Já os linfócitos T-reg vêm sendo relacionados a vias de supressão da resposta imunológica contra tumores, atuando como agentes como pró-tumorais ao inibir respostas das células T citotóxicas, além de estarem significativamente mais expressos em tecidos com câncer (Redman& Chang 2009). Os linfócitos B quando encontrados no microambiente tumoral modelos de melanoma, podem secretar grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, com papéis contraditórios ao favorecer a tumorigênese (DiLillo et al., 2010; Mannino et al., 2015).

A ambiguidade de atuação do sistema imune no desenvolvimento do câncer pode ser explicada pela ampla variedade de funções que este sistema exerce, as quais incluem o reconhecimento e a eliminação de agentes infecciosos e a resolução da inflamação, com sequente

eliminação dos debris celulares e cicatrização (Egeblad et al., 2010). Assim, o balanço entre uma resposta inflamatória pró e anti-tumoral se torna o foco primordial no desenvolvimento de terapias destinadas ao redirecionar essas células em à destruição do tumor.

3.3. Imunoterapias no Câncer

A imunoterapia é um componente central em muitos tratamentos do câncer e se baseia na fortificação ou modulação do sistema imune do paciente para combater as células neoplásicas (Antonia et al., 2014). Muitas terapias fazem uso da imunidade antitumoral, incluindo a imunização passiva com anticorpos monoclonais (Mabs), a utilização de adjuvantes no microambiente tumoral ou de citocinas inflamatórias, e a vacinação contra infecções microbianas oncogênicas como profilaxia. A imunoterapia também é importante componente no transplante de medula no tratamento de neoplasias sanguíneas (Dougan & Dranoff, 2009).

Apesar de ser bem aceita, essa terapia só ganhou força há cerca de uma década, com os adventos da imunologia molecular. Atualmente esta abordagem tem como foco aumentar a atividade da imunidade antitumoral protetora e perturbar as vias reguladoras essenciais para a manutenção da tolerância do tumor, e conta hoje com cerca de pelo menos 20 tratamentos clínicos aprovados, dentre os quais os principais estão descritos na tabela 1 (Angell & Galon et al., 2013).

Tabela 1-Principais Imunoterapias para o câncer aprovadas clinicamente

	INDICAÇÃO	REFERÊNCIAS
TERAPIAS PROFILÁTICAS		
VacinaHBV	CarcinomaHepatocelular	Davis,2005
VacinaHPV	Câncer cervical	Villa,2007
Antibióticos	Câncer Gástrico, Linfoma GástricoMALT 2006	Parkin <i>et al.</i> 2005;Eslick,
ADJUVANTESE		
CITOCINAS		
BacilodeCalmette-Guérin	Câncer SuperficialdaBexiga	Sylvester <i>et al.</i> ,2005
Imiquimode	Carcinomadecélulasbasais, Ceratosectínica	van Seters <i>et al.</i> ,2008

IL-2eINF-α	Melanoma,carcinomade células renais <i>al.</i> ,2002	Atkins <i>et al.</i> ,1999;Motzeret
TNF-α	Sarcomadetecidosmoles, melanoma	Lanset <i>al.</i> ,2005
Palbociclibe	Câncer demama	LuJ,2015
Ibrutinibe	LeucemiaLinfóideCrônica, LinfomadeCélulas doManto eMacroglobulinemia de Waldenström	DeClaro <i>et al.</i> , 2015 Chakraborty <i>et al.</i> , 2015
Vorinostate	Câncer depele	Kavanaugh <i>et al.</i> ,2010
ANTICORPOS		
MONOCLONAIIS		

Rituximabe	LinfomanãoHodgkin, Leucemialinfocíticacrônica & Hagenbeek,2007	Coiffier <i>et al.</i> ,2002;Marcus
Ibritumomabe	LinfomanãoHodgkin	Witziget <i>al.</i> ,2002
Tiuxetana	LinfomanãoHodgkin	Witziget <i>al.</i> ,2002
Tositumomabe	LinfomanãoHodgkin	Fisher <i>et al.</i> ,2005
Alemtuzumabe	Leucemialinfocíticacrônica	Keating <i>et al.</i> ,2002
Nivolumabe	Câncer pulmãoemelanoma Metastático	Bayless& Schneider,2015 Schmid-Bindert,2015
Gentuzumabe	Leucemiamieloblástica Aguda	Brosset <i>al.</i> ,2001
Trastuzumabe	Câncer deMama	Hudis, 2007
Cetuximabe	Câncer Colorretal	Meyerhardt&Mayer, 2005

Panitumumabe	Câncer Colorretal	VanCutsemet <i>et al.</i> ,2008
Bevacizumabe	Câncer Colorretal ePulmão	Bukowski <i>et al.</i> ,2007

3.3.1. Terapias Profiláticas

Uma das principais terapias profiláticas para o câncer é a vacina contra o vírus da hepatite B (HBV). O desenvolvimento do carcinoma hepatocelular associado à infecção pelo vírus HBV é a relação câncer-agente ambiental mais bem estabelecida, onde pacientes com hepatite crônica apresentam um risco de desenvolver o hepatocarcinoma 100 vezes maior que os não infectados pelo vírus (Sherman, 2009). Por esta razão, a vacina contra o HBV foi a primeira terapia profilática desenvolvida contra o câncer (Davis, 2005).

O câncer cervical causa mais de 250.000 mortes por ano em todo o mundo, e os subtipos 16 e 18 do HPV estão associados com 70% dos casos. Assim, as vacinas contra estes subtipos foram desenvolvidas especificamente para a prevenção do câncer cervical através da indução de anticorpos neutralizantes contra as proteínas do capsídeo do HPV, L1 e L2. Ambas as proteínas se organizam em partículas semelhantes aos vírus, que quando expressas em sistemas recombinantes induzem forte resposta humoral pela geração de anticorpos neutralizantes, apresentando uma eficácia de 98% (Villa, 2007).

Assim como as viroses, a infecção bacteriana pela *Helicobacter pylori* está associada ao desenvolvimento do carcinoma gástrico e do linfoma de células B da zona marginal do tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (Parkin et al., 2005; Eslick 2006). Assim, a erradicação da *H. pylori* através do uso de antibióticos tem como objetivo principal evitar as alterações das mucosas, reduzindo as

chances de desenvolvimentos de ambos os tumores gástricos (Wong et al., 2004).

3.3.2. Adjuvantes e Citocinas

Um dos principais adjuvantes utilizados na clínica é o Bacilo de Calmette-Guérin intravesical, eficaz na redução do risco de recidiva e recorrência em pacientes com câncer de bexiga com tumores não-músculo invasivo após ressecção transuretral. Este bacilo é uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* que auxilia a ação das células T da via Th1 (Houghton et al., 2013).

Os microrganismos podem aumentar a resposta imune inata através da ativação da resposta mediada por receptores do tipo Toll, e devido ao seu alto potencial imunogênico agonistas destes receptores estão sendo utilizados como adjuvantes imunológicos na terapia contra o câncer. Um dos exemplos é o imiquimode, agonista do receptor tipo Toll 7 que têm demonstrado eficácia no tratamento de tumores epiteliais de baixo grau e lesões pré-cancerígenas (Zou, 2015). A ativação de receptores tipo Toll 7 além de ativar células apresentadoras de antígenos, também aciona os linfócitos T e NK (Hamm et al. 2009).

As citocinas são mediadores químicos que participam de diversas vias da resposta inflamatória, e são capazes de promover a ativação e diferenciação das células do sistema imune e devido a estas características algumas delas têm sido utilizadas no tratamento de diversos tipos de tumores com eficácia cientificamente comprovada. Como imunoterápico, o $\text{INF-}\alpha$ atua em diversos elementos do sistema imune como na

maturação das células dendríticas apresentadoras de antígenos, ativação das células NK, linfócitos T citotóxicos e macrófagos sobre as células tumorais infectadas com indicação para o tratamento do carcinoma renal metastático como adjuvante à cirurgia (Lamm et al., 2014).

Já a IL-2, devido a sua capacidade de estimulação do sistema imune, tem utilização no tratamento do melanoma e da leucemia mielóide aguda aumentando a sobrevivência dos pacientes, e no carcinoma renal metastático sua utilização tem apresentado remissões em até 30% dos pacientes (Motzer et al., 2002). Em contraste com as atividades imunomoduladoras da IL-2 e do INF- α , a ação citotóxica mediada pelo TNF- α tem sido aplicada localmente na imunoterapia de alguns tumores. Sua ação citolítica tem sido aplicada no tratamento de sarcomas de tecidos moles e melanoma, bem como no tratamento de neoplasias secundárias a AIDS, principalmente no sarcoma de Kaposi (Lans et al., 2005).

3.3.3. Anticorpos Monoclonais

As células tumorais são formas mutantes das próprias células e expressam proteínas específicas que muitas vezes não são reconhecidas como estranhas pelos anticorpos por não serem imunogênicas, e por esta razão não são capazes de ativar as células do sistema imune que necessitam desta (Abbas, 2008). Por esse motivo, pesquisadores usam o processo de produção de anticorpos monoclonais (Mabs) específicos contra proteínas expressas em células tumorais, com o propósito de marcá-las para a morte (Von Mehren, 2003).

As neoplasias hematológicas contam um arsenal diversificado de Mabs para o seu combate, em destaque temos anticorpos que se ligam às proteínas de membrana nesses tipos de neoplasias, como alemtuzumabe que se liga à CD52 neoplásica presente na leucemia linfocítica crônica, o gentuzumabe específico para a CD33 nas leucemias mielóides agudas e o reconhecimento da CD20 no linfoma não Hodgkin e na leucemia linfocítica crônica pelo Mabs rituximabe, ibritumomabe, tiuxetana e tositumomabe (Bross et al., 2001; Fisher et al. 2005; Keating et al. 2002 ; Witzig et al., 2002).

O tratamento de tumores sólidos conta com seis principais Mabs clinicamente aprovados, trastuzumabe, nimotuzumabe, cetuximabe, panitumumabe e bevacizumabe, além do pertuzumabe, inibidor da dimerização do HER 2 e utilizado contra câncer de próstata, mama e ovário. Os quatro primeiros se ligam aos receptores dos fatores de crescimento epidérmicos (rEGF); o cetuximabe e o panitumumabe são aplicados no tratamento de câncer colorretal metastático; o transtuzumabe no câncer de mama; e o bevacizumabe reconhece e bloqueia o VEGF-A e é usado contra o câncer de mama e o glioblastoma (Hudis, 2007; Jonker et al., 2007; van Cutsem et al., 2007).

Muitos Mabs também são capazes de inibir as vias de sinalização dos seus alvos, como o cetuximabe e panitumumabe que inibem a sinalização do receptor do EGF através do bloqueio das interações desta molécula. De forma similar, o rituximabe e o trastuzumabe inibem a angiogênese

dependente do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) através da ligação com este fator (Li et al., 2005).

A produção e utilização de Mabs têm se tornado um mercado cada vez mais promissor e segundo Guimarães (2014) existem mais de 150 indústrias produzindo cerca de 300 Mabs diferentes para o tratamento do câncer, onde a produção de anticorpos monoclonais é o setor que apresenta maior crescimento anual (12,4%). Assim, a identificação de novos receptores tumorais específicos e a sequente produção de Mabs específicos deve expandir o número de tumores que podem ser efetivamente tratados por esta abordagem terapêutica, trazendo assim novas esperanças na erradicação desta patologia (Guimarães, 2014).

4. CONCLUSÃO

A procura por novas terapias imunes contra o câncer tem como principal objetivo o estabelecimento de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos. Muitas terapias imunológicas obtiveram sucesso e atualmente são utilizadas na clínica de forma combinada com a terapia convencional, entretanto riscos como o aumento de doenças autoimunes e a necessidade de terapias complementares têm impulsionado as pesquisas nesta nova abordagem terapêutica do câncer.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

ANGELL, H.; GALON, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. v. 25, n. 2, p. 261-7, 2013.

ANTONIA, S.J.; LARKIN, J; ASCIERTO, PA. Immunotherapy combinations: a review of clinical experience and future prospects. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 24, p. 6258-6268, 2014.

ATKINS, M.B. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*. v. 17, n. 7, p. 2105-16. 1999.

BAILEY, S.R. *et al.* Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Frontiers in immunology*. v. 5, p. 1-13, 2014.

BAYLESS H & SCHNEIDER S. Nivolumab: Immunotherapy in Malignant Melanoma. *Clin J Oncol Nurs*. v. 19, n. 4, p. 430-432, 2015.

BROSS PF, BEITZ J, CHEN *et al.* Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* v. 7, p.1490–1496, 2001.

BUKOWSKI, R.M. *et al.* Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol.* V. 25, n. 29, p. 4536-41, 2007.

CHAKRABORTY, R.; KAPOOR , P.; ANSELL, S.M.; GERTZ, M.A. Ibrutinib for the treatment of Waldenström macroglobulinemia. *Expert Rev Hematol.* p. 1-11, 2015.

COIFFIER, B. *et al.* Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab. *Anticancer Drugs.* v. 2, p. 43-50, 2002.

De CLARO RA, MCGINN KM, VERDUN N *et al.* FDA Approval: Ibrutinib for Patients with Previously Treated Mantle Cell Lymphoma and Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* v. 21, n. 16, p. 3586-3590, 2015.

DENARDO, D.G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* v. 29, p. 309-16, 2010.

DILILLO DJ, MATSUSHITA T, TEDDER TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences.* v.1183, p. 38-57, 2010.

DOUGAN, M., DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* v.27, p. 83-117, 2009.

EGEBLAD, M.; RASCH, M.G.; WEAVER, V.M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol.* v. 22, n. 5, p. 697-706, 2010.

ESLICK, G.D. Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. *World J Gastroenterol* v.12, n. 19, p. 2991-9, 2006.

FISHER RI, KAMINSKI MS, WAHL RL *et al.* Tositumomab and iodine-131 tositumomab produces durable complete remissions in a subset of heavily pretreated patients with low-grade and transformed non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* v. 23, p. 7565–7573, 2005.

GAJEWSKI, T.F; SCHREIBER, H.; FU, Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013; 14: 1014-22.

GUIMARÃES, R. Biotecnologia e indústria farmacêutica no Brasil. Abrasco. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/site/2014/10/biotecnologia-e-industria-farmaceutica-no-brasil/> (Acessado em 18 de Agosto de 2015).

HOUGHTON, B.B.; CHALASANI, V.; HAYNE, D. *et al.* Intravesical chemotherapy plus bacille Calmette-

Guérin in non-muscle invasive bladder cancer: a systematic review with meta-analysis. *BJU Int.* v. 111, n. 6, p. 977-83, 2013.

HANAHAN, D. e WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HUDIS CA. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* v. 357, p. 39–51, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: Inca, 2014.

JONKER, D.J.; O'CALLAGHAN, C.J.; KARAPETIS, C.S. *et al.* Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* v. 357, p. 2040–2048, 2007.

JOYCE, J.A.; FEARON, D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, v. 348, n. 6230, p. 74-80, 2015.

KAVANAUGH SM, WHITE LA, KOLESAR JM. Vorinostat: A novel therapy for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Health Syst Pharm.* v. 67, n. 10, p. 793-797, 2010.

KEATING MJ, FLINN I, JAIN V *et al.* Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fl udarabine: results of a large international study. *Blood.* v. 99, p. 3554–3561, 2002.

LAMM, D. *et al.* Interferon alfa in the treatment paradigm for non-muscle-invasive bladder cancer. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. p. 35. e21-35. e30. Elsevier, 2014

LANS, T.E. *et al.* Isolated limb perfusions with tumor necrosis factor and melphalan for locally recurrent soft tissue sarcoma in previously irradiated limbs. *Ann Surg Oncol*. v. 12, n. 5, p. 406-11, 2005.

LI S, SCHMITZ KR, JEFFREY PD *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. v. 7, p. 301-311, 2005.

LU J. Palbociclib: a first-in-class CDK4/CDK6 inhibitor for the treatment of hormone-receptor positive advanced breast cancer. *J Hematol Oncol*. v. 8, n. 98, p. 1-3, 2015.

MANNINO, M.H. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Let.*, 2015.

MARCUS, R., HAGENBEEK, A. The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl*. v. 67, p. 5-14, 2007.

MOTZER, R.J. *et al.* Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. v. 22, n. 3, p. 454-63, 2004.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PRINT, I. *et al.* Clinical Application of Genetics in Management of Colorectal Cancer. *Intestinal Research*, v. 12, n. 3, p. 184–193, 2014.

QUAIL DF, J.J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.*, v. 19, p. 1423-37, 2013.

SCENEAY, J.; SMYTH, M. J.; MÖLLER, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer metastasis reviews*, v. 32, n. 3-4, p. 449–64, 2013.

SCHMID-BINDERT G & JIANG T. First-line nivolumab (anti-PD-1) monotherapy in advanced NSCLC: the story of immune checkpoint inhibitors and "the sorcerers apprentice". *Transl Lung Cancer Res*. v. 4, n. 3, p. 215-6, 2015.

SCOTT, L.J. Nivolumab: a review in advanced melanoma. *Drugs*, v. 75, n. 12, p. 1413-1424, 2015.

SHERMAN, M. Risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B and prevention through treatment. *Cleve. Clin. J. Med.* v. 76, p. S6–S9, 2009.

SYLVESTER, R.J. *et al.* High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*. v. 66, n. 6 Suppl 1, p. 90-107, 2005.

VAN CUTSEM, E. *et al.* An open-label, single-arm study assessing safety and efficacy of panitumumab in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy. *Ann Oncol.* v. 19, n. 1, p. 92-8, 2008.

VAN SETERS, M. *et al.* Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. *N Engl J Med.* v. 358, n. 14, p. 1465-73, 2008.

VILLA, L. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med.*, v. 356, n. 19, p. 1915-1927, 2007.

VON MEHREN, M.; ADAMS, G.P.; WEINER, L.M. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annual Review of Medicine.* v. 54, p. 343-369, 2003.

WILKE, C.M.; KRYCZEK, I.; WEI S, Z. E.; WU K, WANG G.; ZOU, W. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis.* v. 32, n. 5, p. 643-649, 2011.

WITZIG TE, GORDON LI, CABANILLAS F *et al.* Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* v. 20, p. 2453-2463, 2002.

WONG, S. *et al.* Carcinoma of the anal canal: a local experience and review of the literature. *ANZ J Surg.* v. 74, n. 7, p. 541-6, 2004.

ZOU, B.B.; WANG, F.; LI, L.; CHENG, F.W.; JIN, R. *et al.* Activation of Toll-like receptor 7 inhibits the proliferation and migration, and induces the apoptosis of pancreaticcancer cells. *Mol Med Rep*, 2015.

CAPÍTULO XI

ANÁLISE DE FATORES RELEVANTES E TÉCNICAS BIOANALÍTICAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA PRODUÇÃO DE BIOMEDICAMENTOS

Ingrid Tavares de Lima¹

Douglas Carvalho Francisco Viana²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato:ingridtavaresdelima@gmail.com

RESUMO – *O presente trabalho tem por objetivo avaliar os principais fatores interferentes em cada etapa do processo produtivo, bem como as metodologias usadas no controle de qualidade da produção de biomedicamentos, a fim de garantir a segurança do produto. A metodologia baseia-se na revisão de*

literatura, através de buscas nas bases de dados: PubMed, Portal de Periódicos CAPES, LILACS e SciELO; além de pesquisas nas farmacopéias (brasileira, americana e européia) e resoluções da ANVISA. A qualidade dos biomedicamentos é estabelecida através da caracterização físico-química e biológica da substância ativa/produto final em conjunto com o sistema de produção e controle do processo. Os órgãos regulatórios recomendam que esses produtos sejam testados por uma combinação de testes analíticos para avaliar o peso molecular, o nível de complexidade da proteína, grau de heterogeneidade, propriedades funcionais, perfis de impureza, estabilidade e toxicidade para comprovar que a produção não afete adversamente a identidade, pureza, potência e consistência do produto. A qualidade de um produto só pode ser garantida se toda a produção for pautada nas Boas Práticas de Fabricação devendo todo o sistema de produção ser monitorado a cada etapa do processo sob rigorosos procedimentos, até o produto ser liberado para uso. A legislação brasileira fornece um suporte importante para o desenvolvimento e a comercialização de produtos biológicos.

Palavras chave: Biomedicamentos; Controle de Qualidade; Boas Práticas de Fabricação.

1. INTRODUÇÃO

Os biomedicamentos têm permitido um grande avanço na medicina em relação à prevenção e tratamento de diversas doenças. Por isso, têm o seu processo de obtenção cada vez mais aperfeiçoado,afim de se obter maior eficácia e segurança. Um biomedicamento é definido como um medicamento cuja substância ativa é de origem biológica, ou seja, foi extraída de uma fonte biológica ou passou por um processo biotecnológico. No Brasil, a ANVISA regulamenta os “medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal ou ainda obtidos por procedimentos biotecnológicos. Nestes, incluem-se as vacinas; soros hiperimunes; hemoderivados; biomedicamentos, anticorpos monoclonais; medicamentos contendo microorganismos vivos, atenuados ou mortos” (ANVISA, 2010). Os biomedicamentos são geralmente proteínas (incluindo os anticorpos) ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA) utilizados na terapia ou com objetivo diagnóstico in vivo. São homólogos às proteínas humanas, com as quais possuem alto grau de semelhança ou formam macromoléculas que interagem com elas (WALSH, 2003).

Os processos biotecnológicos permitem a produção de proteínas mais complexas, com maior atividade biológica, mais vida média e menos efeitos colaterais do que as já existentes. No entanto, por ser um processo de produção complexo,as moléculas apresentam estrutura mais pesada e diversa, onde a substância ativa é heterogênea e de difícil caracterização e replicação sendo esta, a principal diferença entre os biofármacos e os

fármacos de origem química convencional (ICH, 1999). A produção de proteínas recombinantes começa pela identificação e caracterização genética da proteína e de suas propriedades bioquímicas. Bem como, pela definição dos requisitos estruturais para sua atividade funcional como por exemplo, processamentos pós-traducionais. O processo produtivo envolve a escolha do vetor de expressão e das células produtoras em função da complexidade de processamento necessário à obtenção da proteína ativa (ARAÚJO, 2011). Diante disto, os biomedicamentos podem ser divididos em:

Biomedicamentos de primeira geração: são produzidos através da transfecção do gene humano para um sistema de expressão celular bacteriano. Após a síntese, essas substâncias recombinantes são isoladas e purificadas. possuem a sequência de aminoácidos idêntica à proteína humana nativa, sendo usadas para reposição ou mesmo para ocasionar aumento no nível dessas substâncias endógenas. Exemplos nessa categoria são: insulina, hormônio de crescimento e fatores de coagulação (INTERFARMA, 2013).

Biomedicamentos de segunda geração: são sintetizados com propriedades terapêuticas planejadas; ou seja, o gene é alterado antes da transfecção. Dessa forma, a estrutura da proteína expressa sai alterada, ou é realizada alguma modificação pós-traducional nos produtos purificados terminais. Geralmente essas alterações visam melhorar aspectos como: pico de atividade biológica, tempo de meia-vida e imunogenicidade. Exemplo: anticorpos monoclonais (INTERFARMA, 2013).

A fabricação de medicamentos é um processo rigorosamente controlado e altamente regulado. Para obter uma licença de fabricação o produtor deve demonstrar às autoridades regulatórias que não só o próprio produto é seguro e eficaz, mas que todos os aspectos do processo de produção estão em conformidade com os padrões de qualidade e segurança.

A qualidade dos biofármacos é estabelecida através da caracterização físico-química e biológica da substância ativa/produto final em conjunto com o sistema de produção e controle do processo. Diferente dos fármacos produzidos por síntese química, os biofármacos são produzidos por procedimentos que envolvem a introdução de um ser vivo ou seu material genético em outro sistema vivo de expressão, gerando moléculas complexas e de difícil caracterização. Assim, qualquer alteração mínima durante o processo produtivo pode originar alterações estruturais significativas levando a ineficácia dos mesmos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é identificar quais são as principais técnicas utilizadas no controle de qualidade de biomedicamentos, levando em consideração aspectos como custo, sensibilidade, especificidade e adequação a escala industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão de literatura através de buscas nas bases de dados: PubMed, Portal de Periódicos

CAPES, LILACS e SciELO, além de pesquisas nas farmacopéias (brasileira, americana e européia) e resoluções da ANVISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de biomedicamentos pode ser resumida nas seguintes etapas: a) manipulação genética, construção do plasmídeo com a inserção do gene de interesse; b) estabelecimento da linhagem celular/sistema de expressão (Upstream); c) cultivo em larga escala das células (biorreatores), esta etapa também chamada de bioprocesso, precisa de otimização, pois alterações de pH, temperatura, concentração de O₂ e de NH₄⁺ podem comprometer o rendimento/qualidade da produção; d) purificação ou downstream; e) formulação final, quando o produto acabado a granel é formulado com excipientes, envasado, rotulado e acondicionado em sua embalagem secundária.

A qualidade de um produto só pode ser garantida se toda a produção for pautada nas Boas Práticas de Fabricação (BPF). A qualidade dos biomedicamentos é estabelecida pela caracterização físico-química e biológica da substância ativa/produto final em conjunto com o sistema de produção e controle do processo. Os ensaios para o controle de biomedicamentos envolvem o uso de animais de laboratório, observando-se uma resposta específica quanto à eficácia (potência) e segurança (toxicidade).

O aumento do número de biomedicamentos disponíveis no mercado não significou a incorporação automática desses produtos às farmacopéias. Atualmente, a farmacopéia Européia é o compêndio que possui o maior número de biomedicamentos contemplados por suas monografias.

United States Pharmacopoeia – USP XXIX: contempla apenas dois biomedicamentos (insulina e somatropina) como monografias específicas. Apesar de não disponibilizar monografias oficiais para outros biomedicamentos, a USP sugere uma série de requisitos que deverão ser avaliados e sugere métodos para essa avaliação, tais como:

- Teor do biomedicamento – avaliar por espectrofotometria no UV/Vis
- Identificação da estrutura primária – avaliar por espectrometria de massas e HPLC
- Pureza – avaliar por eletroforese (SDS PAGE) e cromatografia (HPLC)
- Estrutura de carboidratos – avaliar por espectrofotometria no UV/Vis e HPLC

Farmacopéia Européia 5a edição – EP: da mesma maneira que a USP, a EP prevê requisitos gerais para produtos biotecnológicos (são contempladas apenas monografias para eritropoetina e interferons). A EP determina que o produto deve ser caracterizado quanto a sua identidade, pureza, potencia e estabilidade, utilizando

métodos químicos, físicos, imunoquímicos e biológicos. Nenhum ensaio específico é apontado. Algumas metodologias são sugeridas para a determinação de consistência de produção, tais como:

- Teste de identidade: sequenciamento N terminal e mapa de peptídeos
- Composição de aminoácidos e proteínas do sistema de expressão
- Focalização isoeétrica
- SDS – PAGE e imunoblot
- Teor de proteínas

Esses controles são recomendados para o processo e produto final. Essas monografias demonstram uma preocupação com aspectos regulatórios maiores que nos EUA. No entanto, uma observação interessante é que nem a EP nem a USP recomendam ensaios que avaliam de forma mais direta a estrutura tridimensional de produtos recombinantes.

A legislação brasileira referência para a produção de biológicos é:

Farmacopéia Brasileira 5a edição: contém as monografias de dois biofármacos (insulina e somatropina). Não existem recomendações gerais para produtos oriundos de DNA recombinante nem monografias para outros biomedicamentos.

RDC n. 55, de 16 de dezembro de 2010 (ANVISA): estabelece os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, visando garantir a

qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos. Os procedimentos de registro são determinados pela origem biológica do princípio ativo e pelas tecnologias de fabricação utilizadas.

RDC n. 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA): dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós- registro de medicamentos. Esses métodos são utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas; incluindo ensaios de precisão, exatidão, seletividade e estabilidade.

RDC n. 17, de 16 de abril de 2010 (ANVISA): esta resolução possui o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano.

Os ensaios preconizados na RDC 55 e na farmacopéia Brasileira (2010) para o controle de qualidade de biomedicamentos incluem:

3.1 Ensaios Biológicos (testes de segurança e eficácia)

Teste de esterilidade: Verificação da ausência de bactérias, fungos e leveduras em insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos que, de acordo com a Farmacopéia, devem ser estéreis. A farmacopéia brasileira não aborda sobre este teste em biomedicamentos, entretanto, sabe-se que são necessários, pois a maioria são injetáveis, sendo necessário alto nível de qualidade e esterilidade.

Teste de toxicidade: Determinação da reatividade biológica inesperada e não aceitável de medicamentos através da inoculação do produto em camundongos saudáveis. Esse teste é sugerido para a avaliação da segurança de produtos derivados de biotecnologia.

Teste do pirogênio: Detecção de endotoxina (teste LAL) pelo aumento da temperatura corporal de coelhos, após injeção intravenosa da solução estéril em análise. Usado para detectar ou quantificar lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas presentes em amostras para qual o teste é preconizado. Utiliza-se o extrato aquoso dos amebócitos circulantes do *Limulus polyphemus* preparado e caracterizado como reagente LAL. Há duas técnicas com sensibilidade diferente para este teste: método de coagulação em gel (semi-quantitativo) ou métodos fotométricos quantitativos (turbidimétrico) ou cromogênicos.

Teste de identidade: Identificação do componente designado no rótulo do produto, distinguindo-o de qualquer outro componente presente no processo.

Teste de estabilidade: Capacidade da vacina em manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biológicas dentro do limite de especificação.

Teste de potência: Avaliação da capacidade de um imunobiológico em induzir uma resposta imune específica. Historicamente, o ensaio de potência de vacinas é realizado *in vivo* e consiste na inoculação de diluições seriadas da vacina em análise e da vacina de referência, em camundongos da imunogenicidade. Esse

ensaio foi gradativamente, substituído por ensaios in vitro como os ensaios imunoenzimáticos (FARMACOPÉIA Bras. 2010).Dentre as metodologias utilizadas em ensaios biológicos destacam-se:

Ensaio imunoenzimático (ELISA): método simples, de elevada precisão e exatidão, específico e sensível, que permite o processamento de um grande número de amostras. As vantagens do ELISA incluem reprodutibilidade e automatização, baixo custo e grande número de análises por placa (SOBRINHO, 2008). O objetivo do ensaio é a quantificação ou verificação da presença de um antígeno ou anticorpo na amostra analisada.É utilizado para confirmação dos parâmetros de potência, pureza e qualidade, exigidos para um produto biotecnológico, como o interferon beta humano recombinante, por exemplo. O ELISA pode ainda ser utilizado para confirmação da expressão eficaz da proteína após sua inserção em um plasmídeo (Oliveira, 2009).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): essa técnica demonstra rapidez, sensibilidade e especificidade e tem sido usada para testar contaminantes virais em vacinas produzidas a partir de culturas de células (FERREIRA, 2007). De acordo com a RDC 55, a PCR é usada no controle de qualidade de imunobiológicos através do emprego do teste NAT (Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos). Esse teste foi inicialmente desenvolvido para detecção de ácidos nucleicos dos vírus HIV e HCV em bolsas de sangue destinadas a transfusão. O objetivo era identificá-los precocemente em relação aos testes

sorológicos, pois o teste detecta a existência do próprio vírus no sangue do doador e não a presença de anticorpos. O teste NAT busca a presença do RNA ou DNA viral através da amplificação (reação de PCR em tempo real) sendo possível detectar a partícula viral com antecedência, apresentando alta sensibilidade até no período da janela imunológica (INCA, 2011).

3.2 Ensaios Físico-Químicos (FARMACOPÉIA Bras. 2010).

Espectrometria de absorção atômica: é utilizada para a determinação da concentração do analito na amostra, especialmente metais. Para isso, a radiação, com um comprimento de onda específico de acordo com o elemento analisado, incide sob o vapor atômico contendo átomos livres desse elemento no estado fundamental. A atenuação da radiação é proporcional à concentração do analito segundo a lei de Lambert-Beer.

Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado: técnica bastante abrangente, multi-elementar e que possui elevada sensibilidade. De maneira geral, o aerossol da amostra é introduzido em uma fonte de plasma, onde é evaporado e dissociado em átomos e íons livres que são excitados. O plasma de elevada temperatura gera uma radiação policromática decorrente da emissão de vários íons presentes na amostra. A detecção da radiação gerada por comprimentos de onda específicos pode ser aplicada para análise qualitativa e as intensidades destes comprimentos podem ser usadas para análise quantitativa.

Espectrofotometria no ultravioleta, visível e infravermelho: fundamenta-se na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração, quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o intervalo de frequência da energia aplicada, pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho. Pode ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias.

Espectrofotometria de fluorescência: permite que substâncias sejam analisadas com maior sensibilidade e especificidade. Compreende a medida da fluorescência emitida quando as substâncias são expostas à radiação UV ou visível. Tais radiações promovem a excitação de elétrons da molécula para níveis energéticos mais elevados. Após curta permanência no estado, os elétrons retornam ao estado fundamental emitindo luz.

Espectrometria de massas (MS): é uma ferramenta analítica altamente sensível, utilizada para a identificação de compostos desconhecidos, para a quantificação de espécies moleculares orgânicas, inorgânicas e complexas, e para elucidar a estrutura e as propriedades químicas moléculas de interesse. Utilizando-se MS, compostos-alvo podem ser identificados em concentrações extremamente baixas (femtomols) em misturas quimicamente complexas (FERREIRA, 2008).

Dicroísmo circular: é utilizada em controle de qualidade de biomedicamentos como uma ferramenta importante para a avaliação de elementos da estrutura secundária de proteínas. Pode-se avaliar a presença de alfa-hélice,

folhas beta pregueadas e elementos randômicos assim como, quantificá-los em uma estrutura protéica. A identificação e a quantificação destes elementos se faz importante, pois as perdas da estrutura secundária constituem um indicativo de que o biomedicamento também apresenta perdas na estrutura terciária e estas podem levar a redução total ou parcial da atividade do mesmo (ANDRADE, 2007).

Difração de raios-X: permite identificar a posição dos núcleos dos átomos. Ocorre através do estudo dos ângulos e das intensidades com que um feixe de raios X são espalhados ou difratados, pelos elétrons que circundam cada átomo. Os fármacos podem se cristalizar de diversas formas (polimorfos), podendo apresentar diferenças nas propriedades físicas, químicas, físico-químicas e na biodisponibilidade. Esse polimorfismo decorre das condições empregadas na síntese e purificação da substância. Essas formas cristalinas são facilmente detectadas por difração de raios X (GUTIERREZ, 2013).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN): é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas, tanto aquelas de baixo peso molecular, quanto de macromoléculas como proteínas. Bem estabelecida na análise quantitativa de várias classes de substâncias, tais como, drogas, excipientes, vacinas, produtos naturais, ente outros. Apresenta especificidade, reprodutibilidade, precisão, robustez e, sobretudo praticidade, pois seu uso abole a necessidade de um extenso manuseamento e preparação da amostra. Além

disso, apresenta grau de pureza de 95% ou mais, o que compensa o custo elevado, sua baixa sensibilidade e seu limite de detecção. Apesar do alto custo atrelado à manutenção do equipamento, a utilização de RMN para identificar um grande volume de amostra de fármacos pode ser mais viável que a identificação por CLAE. Considerando os gastos com consumíveis e o curto tempo de aquisição requerido para registrar um espectro. Além de possibilitar uma fácil manipulação da amostra, a quantificação por RMN traz como vantagens adicionais: um baixo tempo de análise, o acesso simultâneo aos aspectos qualitativos e quantitativos da amostra e possibilita a quantificação de vários analitos em uma mesma análise (LEITE, 2013).

3.2.2 Técnicas cromatográficas (FARMACOPÉIA Bras, 2010)

Cromatografia preparativa em coluna: método de separação que desempenha papel importante na purificação de compostos e produção de produtos farmacêuticos. É um método rápido e econômico, para a obtenção de substâncias com pureza elevada. Na prática, adsorventes padronizados são utilizados, pois fornecem um alto grau de confiabilidade do método. A transferência direta de escala de análise e um processamento otimizado. Os tipos de cromatografia em coluna podem ser: por adsorção (líquido-sólido), por partição (líquido- líquido) ou por troca iônica.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC): técnica de separação fundamentada na

distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. Apresenta vantagens como análise de amostras não voláteis e termolábeis, além de tempo curto de análise. Os detectores de espectrometria de massas combinados com a CLAE proporcionam uma alta seletividade. É largamente utilizada na indústria farmacêutica no acompanhamento de produção, controle de qualidade de matérias primas, testes de estabilidade e estudos de impurezas. Possui alta eficiência e sensibilidade (ICH, 1999).

Cromatografia a gás (CG): baseia-se na diferença de distribuição de espécies de uma mistura entre duas fases não miscíveis, na qual a fase móvel é um gás. CG está baseada no mecanismo de adsorção, distribuição de massa ou exclusão por tamanho. É aplicada a substâncias e seus derivados que se volatilizam sob as temperaturas empregadas, e é utilizada para identificação, teste de pureza e determinação quantitativa.

Cromatografia acoplada à espectrometria de massas (LC-MS): mostra-se vantajoso uma vez que, é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural a respeito do analito. Assegurando dessa forma, a sua identificação com maior confiança do que quando ela é realizada apenas com base nas características de retenção das substâncias analisadas, como ocorrem nas outras técnicas cromatográficas. Além disso, quando existem

compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, com a MS sequencial é possível detectá-los individualmente, desde que possuam diferentes massas molares ou gerem diferentes espectros de massas (PEREIRA, 2013).

3.2.3 Técnicas eletroforéticas

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE): é uma das técnicas analíticas mais apropriadas para identificar e assegurar a homogeneidade de proteínas em biomedicamentos. Além de estimar os pesos moleculares de subunidades de proteínas bem como, verificar a presença de subunidades protéicas. Por ação de um campo elétrico, as partículas carregadas migram em direção ao eletrodo de polaridade oposta. No gel, o deslocamento das partículas é retardado pelas interações com o gel da matriz que constitui o meio de migração, resultando na taxa de diferencial de migração de acordo com o tamanho, forma e carga de partículas. Devido às suas propriedades físico-químicas diferentes, as diversas moléculas contidas numa mistura migrarão a velocidades diferentes durante a eletroforese, ficando assim separadas em frações bem definidas. É utilizada para a caracterização qualitativa das proteínas contidas em preparações biológicas, controles de pureza, determinações quantitativas, controle da homogeneidade das proteínas contidas, avaliação da massa molecular das subunidades protéicas e determinação das subunidades que compõem as proteínas purificadas (ANDRADE, 2007).

Como não há determinações exatas nas resoluções e farmacopéias em relação aos biomedicamentos, os ensaios de controle de qualidade mudam de produto para produto. Por exemplo, dentre os ensaios preconizados para a eritropoetina recombinante e Interferon alfa 2b humano recombinante, estão (NASCIMENTO et. al., 2013): Avaliação da potência biológica, Determinação de pH, Volume médio, Identificação por imunoblot, Identificação por SDS-PAGE, Esterilidade, Endotoxina bacteriana.

A eficácia e segurança dos medicamentos devem ser asseguradas por critérios de qualidade previstos na legislação. Visto que, análises não confiáveis podem levar a danos irreparáveis e grandes prejuízos financeiros. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis sobre o produto, ele deve passar pelo processo de validação.

3.3 Validação de metodologias

De acordo com Martins (2009), a validação de um método é um processo contínuo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento do produto. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil exigem a validação e para isso, tem estabelecido diretrizes a serem adotadas no processo. Os principais parâmetros avaliados para uma validação de metodologias usadas na produção de biomedicamentos de acordo com a RDC 27 (ANVISA, 2012) são:

Seletividade: Avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação na substância em exame. Se este parâmetro não for assegurado, as análises dos demais estarão seriamente comprometidas, visto que a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de qualquer método. Devendo ser reavaliada continuamente, pois algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente e que podem interferir na substância de interesse (MARTINS, 2009).

Linearidade: é a capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

Precisão: representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. É avaliada pelo desvio padrão absoluto e pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (MARTINS, 2009).

Exatidão: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Limite de detecção: representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

Limite de quantificação: representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Robustez: mede a sensibilidade que um método apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros

4.CONCLUSÃO

A fabricação de biomedicamentos é um processo rigorosamente controlado e altamente regulado. Para obter um produto eficaz todos os aspectos do processo de produção devem estar em conformidade com os padrões de qualidade e segurança. Cada etapa do processo produtivo apresenta particularidades e qualquer interferência pode originar alterações estruturais significativas, podendo levar a ineficácia dos fármacos. Portanto, a garantia e controle de qualidade devem ser assegurados através do cumprimento das boas práticas de fabricação e realização de diferentes técnicas analíticas.

Os principais ensaios preconizados nas resoluções e farmacopéias são os biológicos (esterilidade, potência, toxicidade, potência) e os físico-químicos (técnicas espectrométricas, eletroforéticas e cromatográficas). As principais metodologias usadas para esses testes são: HPLC, PCR, ELISA, LC-MS e RMN visto que são técnicas sensíveis, específicas, reprodutíveis, rápidas e

que garantem a pureza e qualidade do produto, compensando assim o seu alto custo. Diante do exposto, concluímos que o controle de qualidade é vital em todas as etapas da produção de biomedicamentos para garantir a eficácia e a segurança do produto e conseqüentemente a saúde humana e que o uso de metodologias de alta sensibilidade e especificidade se faz essencial.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, Sinéa Mendes. Avaliação de Metodologias de Controle de Qualidade de Biomedicamentos de Tecnologia Dna Recombinante de Uso Humano. Rio de Janeiro, 2007. Monografia (Especialização em controle da qualidade vinculados à vigilância sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ.

ANVISA, Farmacopéia Brasileira. Volume 1, 5o edição, Brasília, 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em: 10 de julho de 2015.

ANVISA, RDC No 17, de 6 de abril 2010. Estabelece o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano. Brasília, Diário oficial da união, 2010.

ANVISA, RDC N.o 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília, Diário oficial da união, 2012.

ANVISA, RDC No 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Brasília: Diário oficial da união, 2010.

ARAÚJO, Ana Paula de. Desenvolvimento de Metodologia para Mapeamento Peptídico da Eritropoetina Humana Recombinante visando o Controle em Processo da Produção em Bio- Manguinhos. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação de Mestrado em tecnologia de imunobiológicos. Fundação Oswaldo Cruz.

BRASS, J. M., KRUMMEN, K., MOLL-KAUFMANN, CHRISTINE. Quality assurance after process changes of the production of a therapeutic antibody, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 71, p. 395-403, 1996.

BIOLOGICAL Standartization and control. A Scientific Review commissioned by the UK. *National Biological Standards Board* (NIBSB). 1997. 22 p

BHOPALE, G. M.; NANDA R. K. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Current Science*, v. 89(4), 2005.

COSTA, Catia Inês. Estratégia metodológica para avaliação da potência in vitro das vacinas contra o vírus da hepatite B utilizada no Programa Nacional de Imunizações- PNI – Brasil. Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

DAL MONTE, P. R., ROUAN, S. K. E., BAM, N. B., Biotechnology-Based Pharmaceuticals. In: DEKKER, M. *Modern Pharmaceuticals*, 4º ed. Rev. New York, 2002. p.838.il. (Drugs and Pharmaceutical Sciences, 121)

DELLEPIANE, N., GRIFFITHS, E., MILSTIEN, J. B. New challenges in assuring vaccine quality. *Bulletin of the World Health Organization*. 78(2), 2000.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005. 1 CD ROM

FERREIRA, C. R. Utilização da espectrometria de massas para controle de qualidade de meios de cultivo e do soro fetal bovino utilizado para a produção in vitro de embriões bovinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

FERREIRA, R. L. Detecção de micoplasmas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Produtos Intermediários da Vacina contra Febre Amarela Produzida em Bio- Manguinhos/FIOCRUZ. Dissertação de mestre em Tecnologia de Imunobiológicos. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

FERMAN, M. K. S. Capacitação Brasileira para Produção de Medicamentos Biológicos Similares. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação de Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry Quality Considerations in

Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, February 2012.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, v. 22, n.11, nov. 2004.

GUTIERREZ, S. A. Instituto de Química (IQ). Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP, Brasil. 2013).

HOKAMA, D. A. Avaliação das Melhorias no Sistema de Controle de Qualidade de vacinas em Bio-Manguinhos. Período 1999-2004. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

HOMMA A. Commentary, Regulations of vaccines: Strengthening the science base by Julie Milstein. *Journal of Public Health Policy*. Vol.25, N°2; 190-196; 2004.

INSTITUTO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E QUALIDADE (ICTQ). Disponível em: <http://>

MARTINS, Ismael Leite. Desenvolvimento e Validação de Métodos Bioanalíticos Para Quantificação da Amoxicilina, Norfloxacino e Oxcarbazepina em Estudos Farmacocinéticos. Tese de doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). I Jornada de profissionais técnicos da saúde do INCA.

Testes sorológicos. Rio de Janeiro, 2011. <http://ictq.com.br/portal/colunas-materias/medicamentos-biologicos-no-brasil-114#ixzz3i92sGIpV>. Acesso em: 05 de Agosto de 2015.

INTERFARMA, Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa; AMB - Associação Médica Brasileira. Medicamentos biológicos na prática médica. São Paulo, Editora Interfarma, 2013.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization (ICH). Guidance on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. Geneva, Switzerland: ICH Secretariat; August 1999.

LEITE, L. L. B. Aplicação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq- 1H) na área farmacêutica e afins. Monografia. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2013.

LUYKXet al. HPLC and tandem detection to monitor conformational properties of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography B*, v. 821, p. 45-52, 2005.

NÄRHI, M., NORDSTRÖM, K., Manufacturing regulatory and commercial challenges of biopharmaceuticals production: a Finnish perspective. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 397-405, jan. 2005.

NASCIMENTO, M. C.; ABREU, C. L. C. A eritropoietina humana recombinante: uma breve revisão com ênfase no processo de controle da qualidade. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 11, n. 1, p. 43-55, 2013

NUNES, A. R. A. Medicamentos Biológicos: Situação Atual e Perspectivas Futuras. Lisboa, 2014. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

OLIVEIRA, C. C. P. Metodologias iniciais para implementação de um ELISA para detecção do Interferon Beta Humano recombinante (1a) com aplicação no controle de qualidade de Bio-manguinhos. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

PARKINS, D. A., LASHMAR, U. T. The formulation of biopharmaceutical products. *Pharmaceutical Science & Technology Today* v. 3(4), 2000.

PONTES, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. *História, ciência e Saúde. Manguinhos*, v.10, p.619-53, 2003.

PEREIRA, M. U. Determinação de resíduos de ionóforos poliéteres em leite por LC-MS/MS. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

ROSEMBERG, G. A. ISSO 9001 na Indústria Farmacêutica – Uma abordagem das Boas Práticas de Fabricação. E-papers Serviços Editoriais RJ, 2000.

SCHELLEKENS, H. How similar do ‘biosimilars’ need to be? *Nature Biotechnology*, v. 22(11),2004.

SOBRINHO, E. M. Métodos in vitro para controle de qualidade de vacinas clostridiais. Dissertação de mestrado em ciências. Universidade Federal de Minas gerais, UFMG, 2008.

THE UNITED States Pharmacopeia. 29.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006. 3539 p. il. 1 CD-ROM

WALSH, G. Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnonology. 2 ed. England. Wiley, 2003. 551 p.

WALSH, G. Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications. England. Wiley, 2007.6.

CAPÍTULO XII

TRATAMENTO DE ÁGUA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Laís Regina de França Alves¹

Simão Kalebe Silva de Paula²

Luiz Alberto Lira Soares³

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

³Departamento de Farmácia, UFPE

E-mail de contato: laisfranca_alves@yahoo.com.br

RESUMO - *A água é um bem essencial para a vida e todas as atividades relacionadas com a sua manutenção. As indústrias, grandes produtoras de diversos produtos necessários à vida humana, utilizam enormes quantidades de água nas suas cadeias produtivas. Uma das indústrias que mais usa água é a farmacêutica, principalmente porque a água está presente na composição de diversos medicamentos. Por conta disso, a indústria farmacêutica necessita de água de alta pureza e qualidade para utilizar nos seus produtos.*

Dependendo do grau de pureza e do uso, a água pode ser classificada em potável, reagente, purificada, para injetáveis e ultrapurificada. Cada uma delas é produzida por uma sequência de operações distinta. Elas também se diferenciam pelos equipamentos e instrumentos de controle usados, pelos parâmetros que devem obedecer, pelas análises físico-químicas e microbiológicas que são realizadas, pelas condições de produção, distribuição e armazenamento e pelos critérios de monitoramento e validação.

Palavras chave: Tratamento de água, indústria farmacêutica, validação, monitoramento.

1. INTRODUÇÃO

A água é um elemento essencial para a vida humana, seja para saciedade própria, para realizar atividades domésticas ou para auxiliar na produção de muitos insumos de que o homem precisa.

Grande parte desses insumos é produzida pelas indústrias. A água está presente na cadeia produtiva de qualquer indústria, pois mesmo que ela não faça parte diretamente dos produtos que a mesma comercializa, existem muitas das suas atividades requerem o uso de água, como análises laboratoriais, manutenções, limpezas, entre outros.

Uma das indústrias que mais utiliza a água como matéria-prima direta na produção é a farmacêutica. A maioria dos medicamentos possui água em sua

composição. Devido à seriedade que isso representa, é necessário utilizar água de altíssima qualidade.

Na indústria farmacêutica são encontrados diferentes tipos de água, que se diferenciam pelos parâmetros de qualidade que obedecem, visando o uso ao qual se destinam: água potável, água reagente, água purificada, água para injetáveis e água ultrapurificada.

Cada um desses tipos de água é produzido através de uma sequência diferente de tecnologias. Elas também possuem parâmetros de controle, análises físico-químicas e microbiológicas, condições de produção, distribuição e armazenamento bem definidas e que devem ser obedecidas.

O presente trabalho tem o objetivo de descrever de forma geral o sistema de tratamento de água na indústria farmacêutica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Água

A água é insumo de fundamental importância para a vida dos seres vivos e para a grande maioria das atividades domésticas, agrícolas e industriais. O uso irracional dos recursos hídricos e a crescente demanda por este insumo preocupam, gerando incertezas em relação à disponibilidade da água em longo prazo (CASTRO, 2012).

A água é uma matéria-prima indispensável para a indústria farmacêutica. Ela é um dos principais componentes de medicamentos, pois, devido à sua grande

versatilidade, possui a capacidade de se agregar a diversos compostos. Mas ela também pode se agregar a contaminantes químicos e/ou microbiológicos, comprometendo a qualidade e os efeitos esperados dos medicamentos. Sendo assim, a composição da água deve ser rigorosamente analisada e controlada, desde a obtenção, passando pela distribuição e chegando até o armazenamento (CESARIO, 2013; OLIVEIRA e PELEGRINI, 2011).

2.2 Contaminantes da água

Os principais contaminantes das águas se dividem em dois grupos: químico e microbiológico. Os contaminantes químicos podem ser orgânicos ou inorgânicos. Eles podem se originar de diferentes formas: de resíduos de produtos usados na limpeza e sanitização de equipamentos, do sistema de alimentação, de resíduos poluentes, da absorção de gases da atmosfera, entre outros. Pode-se citar como exemplo de contaminantes químicos as endotoxinas bacterianas (BRASIL, 2010).

Esse grupo de contaminantes pode ser monitorado através dos ensaios de carbono orgânico total (COT) e de condutividade. A determinação de carbono orgânico total permite a quantificação dos átomos de carbono ligados por covalência em moléculas orgânicas presentes na amostra. Trata-se de um método sensível e inespecífico. Baixos níveis de COT significam que existem poucos átomos de carbono ligados por covalência em moléculas orgânicas, ou seja, sugerem a ausência de substâncias químicas potencialmente perigosas na água. As análises

podem ser feitas de acordo com diferentes métodos, seja em laboratório ou em linha. Porém, estes diferentes métodos se baseiam na oxidação completa das moléculas orgânicas a dióxido de carbono (BRASIL, 2010).

Figura 1 - Analisador de COT (escala laboratorial).



Fonte: <http://pt.hach.com>

Figura 2 - Analisador de COT (escala industrial – em linha).



Fonte: <http://www.br.endress.com>

A condutividade é a medida do fluxo de elétrons, o qual é facilitado pela presença de íons. As moléculas de água se dissociam em íons dependendo do pH e da temperatura, resultando numa condutividade. Sendo assim, intrinsecamente, a água contém íons e condutividade. Mas seu contato com a atmosfera e outros meios altera a condutividade devido às impurezas que ela adquire. As análises se baseiam no uso de eletrodos calibrados (BRASIL, 2010).

2.3 Classificação da água para uso farmacêutico

De modo geral, existem três tipos de água que são usados na fabricação de medicamentos: a água purificada (AP), a água para injetáveis (API) e a água ultrapurificada (AUP). A água potável e a água reagente também são utilizadas na indústria farmacêutica (CESARIO, 2013; BRASIL, 2010).

A água potável é obtida por tratamento da água dos mananciais, através de métodos adequados para atender às especificações da legislação vigente, a Portaria MS nº 2914/2011. Ela pode ser usada para limpeza de instalações e equipamentos, para climatização térmica de alguns acessórios e na síntese de componentes intermediários, mas seu principal uso é como a matéria-prima para a água de maior grau de pureza (BRASIL, 2010; OLIVEIRA; PELEGRINI, 2011).

A água reagente pode ser produzida por diversos processos, como destilação simples, filtração, deionização, descloração, entre outros, desde que ela atinja as características específicas para o uso ao qual ela

se destina. Ela pode ser utilizada para limpeza e para o abastecimento de equipamentos, como, por exemplo, autoclave e banho-maria (BRASIL, 2010).

A água purificada é resultante da água potável que passou por algum tipo de tratamento visando remover os possíveis contaminantes e atender aos requisitos necessários de pureza. Ela não contém nenhuma outra substância adicionada e é resultado de combinações de sistemas de purificação: destilação, troca iônica, osmose reversa, eletrodeionização, entre outros. Esse tipo de água é usado como matéria-prima em cerca de 90% dos produtos fabricados na indústria farmacêutica e pode influenciar na qualidade destes produtos se estiver contaminada, acarretando a perda dos mesmos, efeitos indesejados e prejuízos financeiros à empresa (BRASIL, 2010; OLIVEIRA; PELEGRINI, 2011).

A água para injetáveis é usada na preparação de medicamentos para administração parenteral de pequeno e grande volume, como veículo, na dissolução ou diluição de substâncias e preparações. O processo de obtenção desse tipo de água se dá por meio da destilação. A água de alimentação deve ser, pelo menos, potável e, normalmente, precisa de pré-tratamento. Podem ser usados agentes microbianos, se necessário. A água para hemodiálise e a água estéril para injeção estão incluídas dentro desse grupo de API (CESARIO, 2013; BRASIL, 2010).

A água ultrapurificada é o resultado da água purificada que passou por tratamento adicional com o objetivo de retirar os possíveis contaminantes e obedecer aos requisitos necessários de pureza. É usada em aplicações mais exigentes, como diluições de substâncias de referências, laboratórios de ensaios, controle de qualidade, limpeza final de equipamentos, análise de resíduos e preparações de calibradores. A AUP caracteriza-se por ter baixa concentração iônica, baixo nível de COT e baixa carga microbiana. Recomenda-se que a AUP seja usada no momento em que é produzida ou no mesmo dia da coleta (BRASIL, 2010). A tabela 1 resume as principais informações sobre os tipos de água para uso farmacêutico, suas principais características, parâmetros críticos sugeridos e exemplos de aplicação.

2.4 Tecnologias para tratamento de água

Os processos utilizados para obtenção dos tipos de água para uso farmacêutico empregam operações unitárias sequenciais que possuem similaridades. Os projetos, as instalações e a operação dos sistemas para obtenção de AP, API e AUP possuem componentes, estratégias de controle e procedimentos basicamente semelhantes, o que permite estabelecer uma base comum para os mesmos. A grande diferença está no grau de controle e nos estágios finais de tratamento que visam remover bactérias, endotoxinas bacterianas e reduzir a condutividade (BRASIL, 2010).

Alguns dos parâmetros importantes que devem ser considerados no projeto de um sistema de purificação

de água são a qualidade da água de fornecimento, a qualidade final desejada da água, o layout das tubulações e conexões, a vazão necessária, os instrumentos de monitoramento, o material utilizado, a distância entre o sistema de produção e os pontos de uso e as facilidades de assistência técnica e manutenção (BRASIL, 2010; OLIVEIRA e PELEGRINI, 2011).

O tratamento amplamente empregado para obtenção da água potável chama-se pré-tratamento. Ele é constituído de quatro fases consecutivas.

A fase de coagulação e floculação inicia com a dosagem de produtos químicos na água bruta que chega às instalações da empresa. Geralmente são utilizados produtos químicos com as seguintes funções: desinfecção inicial, correção de pH, coagulação e aglutinação. Para desinfecção inicial usa-se um desinfetante e os mais utilizados são o hipoclorito de sódio, o ácido dicloroisocianúrico e cloro. Para correção de pH pode-se usar ácido ou base dependendo do pH da água recebida e os compostos mais usados são ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Para promover a coagulação, ou seja, neutralizar e unir as cargas das partículas em suspensão contidas na água, pode-se utilizar cátions polivalentes, como o sulfato de alumínio polimerizado. Para promover a aglutinação, ou seja, unir os coágulos formando flocos de tamanho maior, são usados polímeros (ALVES, 2014).

Tabela 1 - Tipos de água para uso farmacêutico.

<i>Tipo de Água</i>	<i>Características</i>	<i>Parâmetros críticos sugeridos</i>	<i>Exemplos de Aplicação</i>
Água Potável	Obtida de mananciais ou da rede de distribuição pública.	Possui legislação específica.	Limpeza em geral e fonte de alimentação de sistemas de tratamento.
Água Reagente	Água potável tratada por deionização ou outro processo. Possui baixa exigência de pureza.	Condutividade de 1 a 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 0,2 M Ω -cm) COT < 0,20 mg/L	Lavagem de material, abastecimento de equipamentos, autoclaves, banho-maria, histologia, usos diversos.
Água purificada	Níveis variáveis de contaminação orgânica e bacteriana. Exige cuidados de forma a evitar a contaminação química e microbiológica. Pode ser obtida por osmose reversa ou por uma combinação de técnicas de purificação a partir da água potável ou da reagente.	Condutividade de 0,1 a 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5°C (resistividade > 1,0 M Ω -cm); COT < 0,50 mg/L; Contagem total de bactérias < 100 UFC/mL Ausência de Pseudomonas e outros patogênicos.	Produção de medicamentos e cosméticos em geral, farmácias, lavagem de material, preparo de soluções reagentes, meios de cultura, tampões, diluições, microbiologia em geral, análises clínicas, técnicas por Elisa, radioimunoensaio, aplicações diversas na maioria dos laboratórios, principalmente em análises qualitativas ou quantitativas menos exigentes (em %). Em CLAE (em %).
Água para injetáveis	Água purificada tratada por destilação ou processo similar.	Atende aos requisitos químicos da água purificada e exige controle de endotoxina, partículas e esterilidade. Contagem microbiológica < 10UFC/100 mL. Endotoxinas < 0,25 UI de endotoxina/mL; COT < 0,50 mg/L.	Como veículo ou solvente de injetáveis, fabricação de princípios ativos de uso parenteral, lavagem final de equipamentos, tubulação e recipientes usados em preparações parenterais. Usada como diluente de preparações parenterais.
Água ultrapurificada	Para análises que exigem mínima interferência e máxima precisão e exatidão. Baixa concentração iônica, baixa carga microbiana e baixo nível de carbono orgânico total. Água purificada tratada por processo complementar.	Condutividade de 0,055 a 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C \pm 0,5 °C (resistividade > 18,0 M Ω -cm) COT < 0,05 mg/L (alguns casos < 0,003 mg/L) Contagem total de mesófilos < 1 UFC/100mL (se utilizada para fins farmacêuticos).	Dosagem de resíduos minerais ou orgânicos, endotoxinas, preparações de calibradores, controles, SQR, espectrometria de absorção atômica, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometria de massa, procedimentos enzimáticos, cromatografia a gás, CLAE (ppm ou ppb), biologia molecular e cultivo celular etc. Eventualmente em preparações farmacêuticas que requeram água de alta pureza

Esses flocos de tamanho maior contendo as impurezas que desejava-se remover da água facilitam a fase seguinte, decantação, que baseia-se na diferença de densidade e solubilidade dos componentes. Os flocos de impurezas depositam-se no fundo do decantador e a água clarificada localiza-se na parte superior do decantador, de onde é destinada para a etapa seguinte. A fase de filtração tem a função de remover partículas de tamanho menor que ainda encontram-se em suspensão. Ao final realiza-se outra desinfecção, da mesma forma que é feita a inicial e com o mesmo objetivo (ALVES, 2014).

Depois de realizar as etapas de pré-tratamento, a água já adquire certa qualidade e, se for confirmado através de ensaios que ela possui qualidade de água potável, ela pode ser destinada para a produção de água purificada.

Existem diversas tecnologias que podem ser usadas na produção de água purificada, sendo as mais comuns mostradas a seguir.

Tabela 2 - Tecnologias mais comuns para purificação de água.

<i>Deionização</i>	A água a tratar é passada por uma coluna com grãos de uma resina de troca iônica.
<i>Osmose reversa</i>	A membrana de osmose reversa atua como uma barreira seletiva a todos os sais dissolvidos, moléculas orgânicas e inorgânicas.
<i>Ultrafiltração e/ou eletro-deionização</i>	Separa macromoléculas de diâmetros de até 0,01 micrômetros.

Fonte: OLIVEIRA e PELEGRINI, 2011

2.5 Distribuição, sanitização e armazenamento de água

O sistema de distribuição de água deve ser adequadamente projetado para funcionar da maneira esperada, deve ser validado e deve garantir que não haja qualquer tipo de contaminação. As válvulas, as tubulações, os acessórios, os equipamentos e os instrumentos de monitoramento devem ter construção e acabamento sanitário. Volumes mortos devem ser evitados. A recirculação constante da água e a manutenção da temperatura adequada devem ser garantidas (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

Existem várias maneiras de sanitização dos sistemas de produção, armazenamento e distribuição. Pode ser feito o uso de temperatura e/ou agentes químicos, como compostos halogenados, peróxido de hidrogênio e ozônio. É necessário que os materiais de construção do sistema sejam resistentes a esses dois agentes. Assim como o sistema de distribuição, a estratégia de sanitização deve ser validada. A frequência de sanitização depende dos resultados do monitoramento e das curvas de tendência (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

O armazenamento deve ser feito de forma que a qualidade da água não seja alterada. Deve-se levar em consideração que quanto maior o grau de purificação da água, mais rápido ela tende a se recontaminar. O sistema de armazenamento também deve ser validado. A água ultrapurificada não deve ser armazenada por um período

maior que 24 horas. Os reservatórios devem ser de material inerte e limpo e devem estar protegidos de fontes de luz e calor impróprios. Reservatórios para API devem ser encamisados, para manter a água circulando em temperatura superior a 80°C. (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013)

2.6 Validação do sistema tratamento de água

O objetivo da validação é assegurar a confiabilidade do sistema de obtenção de água para uso farmacêutico, desde a sua obtenção, passando pelo armazenamento e pela distribuição, até chegar ao ponto de uso. A validação abrange a qualificação do projeto (QP), a qualificação da instalação (QI), a qualificação da operação (QO) e a qualificação do desempenho (QD). (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013)

O plano de validação de um sistema de água inclui várias etapas: deve-se conhecer o padrão de qualidade da fonte de alimentação; estabelecer o padrão de qualidade da água; definir as tecnologias usadas para o tratamento e a sequência; escolher os materiais de construção; desenvolver os protocolos de QP, QI, QO e QD; definir os parâmetros críticos, níveis de alerta e ação; estabelecer a periodicidade de sanitização e monitoramento e determinar um plano de manutenção de validação (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

2.7 Monitoramento do sistema de tratamento de água

O monitoramento do sistema de tratamento é de extrema importância visto que é ele que vai mostrar se o

sistema é capaz de produzir água com a qualidade esperada. Todos os pontos críticos e representativos do sistema devem ser monitorados. A frequência de retirada das amostras e os ensaios para garantir a qualidade da água são definidos na validação. Qualquer alteração no plano original tem que ser revalidada. Os equipamentos e instrumentos utilizados devem ser calibrados e capazes de fornecer a leitura na faixa requerida, de acordo com a pureza definida. Todas as leituras feitas e os resultados de ensaios devem ser registrados. Todos os procedimentos previamente definidos devem ser cumpridos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013).

3. CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos mencionados no texto, pode-se entender a importância do tratamento de água para a indústria farmacêutica, visando atender a legislação vigente e os parâmetros de qualidade requeridos para comercialização dos medicamentos.

Foi possível entender quais são as tecnologias usadas para produzir cada tipo de água, qual a importância do monitoramento e da validação na garantia da qualidade do produto e que muitos outros aspectos também influenciam como o projeto, a distribuição, o armazenamento e a sanitização.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram atingidos, uma vez que foi adquirido conhecimento sobre os contaminantes encontrados nas águas, classificação de

água para uso farmacêutico, aspectos importantes nas tecnologias de tratamento de água, parâmetros considerados na distribuição, sanitização e armazenamento de água, critérios da validação do sistema de tratamento de água e aspectos gerais do monitoramento do sistema de tratamento de água.

4. REFERÊNCIAS

ALVES, L.R.F. Otimização do Sistema de Tratamento de Água e Osmose Reversa de uma Indústria de Resina Polietileno Tereftalato. Relatório de Estágio (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira (FB), 5ª edição, v.1. Brasília-DF, 2010.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N.º 17, de 16 de abril de 2010: Dispõem sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 16 de abril de 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Qualidade para Sistemas de Purificação de Água para Uso Farmacêutico. Brasília-DF, 2013.

CASTRO, C. N. Gestão das águas: experiências internacional e brasileira. IPEA, 2012. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_c

ontent&view=article&id=15034>. Acesso em:
07/08/2015

CESARIO, B.C. A Qualidade do Sistema de Purificação de Água para Uso Farmacêutico. IX Congresso Nacional de Excelência em Gestão. Rio de Janeiro, 2013.

OLIVEIRA, F.C.; PELEGRINI, D.D. Controle de Qualidade do Sistema de Produção de Água Purificada obtida por Osmose Reversa em Indústria Farmacêutica. Saúde e Biologia, v. 6, n.1, p. 36-42, jan/abr, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP, Farmacopeia Norte Americana), 35a Edição, 2012.

CAPÍTULO XIII

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMAS HETERÓLOGOS PROCARIOTO E EUCARIOTO

Laís Rodrigues Moura¹

Lilia Vieira Galdino²

Tiago Rafael de Sousa Nunes²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

Michelly Cristiny Pereira²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: laism8@gmail.com

RESUMO – *A produção de proteínas terapêuticas mudou o panorama dos cuidados com a saúde nas últimas décadas. Proteínas apresentam importante função na sinalização, adesão e ciclo celular, além da resposta imunológica. A produção de uma proteína recombinante pode ser obtida tanto em sistemas de*

expressão de organismos procariotos (E. coli) como de eucariotos (leveduras, células de inseto, células de mamíferos, animais transgênicos, plantas transgênicas). Foi efetuada uma revisão da literatura nacional e internacional, retrospectiva, sendo selecionados os que obtiveram destaque acerca do assunto. Qualidade, funcionalidade, rapidez e eficiência na produção, são consideradas os fatores mais importantes em escolher um sistema de expressão apropriado. Considerando os objetivos da implantação da biotecnologia molecular, pesquisas foram direcionadas almejando alcançar níveis satisfatórios de produção de proteínas recombinantes. Entretanto, não há uma única estratégia que seja eficiente para todos os casos, uma vez que diferentes genes requerem investimentos e tentativas específicas, com distintos protocolos de indução.

Palavras chave: proteínas recombinantes, sistemas de expressão, aplicações industriais.

1. INTRODUÇÃO

Proteínas apresentam importante função na sinalização celular, resposta imunológica, adesão celular e ciclo celular. Proteínas nativas e recombinantes beneficiam os principais setores das indústrias biofarmacêutica, enzimática e agrícola. Os produtos destas indústrias por sua vez, beneficiam as áreas da medicina, diagnóstico, alimentação, nutrição,

detergentes, têxteis, couro, papel, celulose, polímeros e plásticos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Nos últimos anos, mais de 200 produtos farmacêuticos entre peptídeos e proteínas estão na lista do Food and Drug Administration (FDA). Alguns dos produtos farmacêuticos produzidos a partir de proteínas recombinantes são a insulina humana, a albumina, o hormônio de crescimento humano (HGH), fator VIII, entre outros (REIS et al., 2009).

O estudo objetiva expor o cenário atual de proteínas recombinantes, apresentar e descrever vantagens e desvantagens de sistemas de expressão utilizados na indústria farmacêutica, comparando-os quando possível.

2. METODOLOGIA

Foi efetuada uma revisão da literatura nacional e internacional, retrospectiva, utilizando os bancos de dados online: National Library of Medicine, Estados Unidos (MEDLINE), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). A pesquisa bibliográfica incluiu artigos online, livros e artigos indexados.

Para inclusão nesta revisão foram selecionados materiais que apresentaram informações do cenário

industrial para produção de proteínas recombinantes além daquelas que apresentaram conteúdos sobre expressão de proteínas em sistemas procariotos e eucariotos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes têm sido alvo da indústria biotecnológica para produção de terapêuticos, profiláticos e diagnósticos para aplicações humanas e na medicina veterinária. As empresas líderes do mercado são Pfizer, Novartis, Sanofi-Aventis, Merck, Roche, GlaxoSmith Kline, Astra Zeneca, Johnson & Johnson, Eli Lilly e Abbott (EXAME, 2013). Os privilégios da biotecnologia moderna ainda são inacessíveis a maioria países.

A aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) exige o desenvolvimento de proteínas terapêuticas de alta qualidade com a heterogeneidade e contaminação mínima (BIRCH & RACHER, 2006). Para produção das proteínas recombinantes é necessário após a subclonagem do DNA em vetores de expressão, sua introdução em sistema de expressão para que a proteína desejada seja traduzida sob condições controladas. A escolha de um sistema de expressão adequado depende de fatores como qualidade, funcionalidade, rapidez e eficiência na produção. São utilizados sistemas procarióticos (bactérias) e eucarióticos (leveduras,

células de insetos, células de mamíferos, animais e plantas transgênicos) (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

3.2 Sistema procarioto (*E. coli*)

O sistema procarioto mais comum é com a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*). A escolha da cepa é um fator importante para a produção de proteínas recombinantes, pois deve ser ausente de proteases agressivas, o que é comum em procariotas (SORENSE *et al.*, 2005). Este sistema de expressão apresenta crescimento e expressão rápidos, facilidade no cultivo, alto rendimento e baixo custo (ZHANG *et al.*, 2011). No entanto, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, o efeito tóxico da proteína recombinante sobre a bactéria.

3.3 Sistema eucarioto

Muitas proteínas apresentam atividade biológica após sofrerem modificações pós-tradicionais, sendo ideal a produção em sistema de expressão de eucariotos como, por exemplo, leveduras, células de insetos, células de mamíferos, animais transgênicos e plantas transgênicas.

Alguns exemplos de cepas de leveduras são a *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* e *Hanselua polimorpha* (CELIK *et al.*, 2011). Ainsulina, antígeno de superfície da hepatite B, urato oxidase, glucagons, hirudina e fator de crescimento derivado de plaquetas são produtos no mercado que utilizam a *S. cerevisiae* (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). *P. pastoris* apresenta como

vantagens a capacidade de segregar proteínas, a capacidade de formar ligações dissulfeto e promover a glicosilação de proteínas.

O sistema de expressão de proteínas em células de inseto são capazes de obter modificações pós-traducionais mais complexas do que pode ser alcançado com leveduras. Este sistema utiliza o Baculovírus como vetor para produção de proteínas. Os principais benefícios são o adequado dobramento de proteínas e formação da ligação S-S, altos níveis de expressão, segurança, flexibilidade no tamanho da proteína a ser produzida, eficiente clivagem de peptídeos sinal e expressão simultânea de múltiplos genes (WILKINSON E COX, 1998).

O sistema em células de inseto apresentam algumas desvantagens como, por exemplo, os padrões particulares de processamento pós-tradução e expressão devem ser determinados para cada construção, proteínas dobradas imprópriamente devido a expressão tardia no ciclo de infecção, baixos níveis de expressão o que pode ser aumentado com a otimização do tempo de expressão e multiplicidade de infecção, além de glicosilação incorreta (BISBEE, 1993; DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Para produção de anticorpos é comum sistemas de expressão utilizando células de mamíferos. O sistema apresenta secreção deficiente, potencial para contaminação do produto final, demanda muito dinheiro

e alto custo para obter aprovação do FDA (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A produção de proteínas recombinantes no leite, clara de ovo, sangue, urina, plasma seminal e casulos de bicho seda acontecem devido ao sistema de animais transgênicos (BREM *et al.*, 1993). O Atrym® foi o primeiro medicamento a partir de animais geneticamente modificados a ser aprovado pelo FDA em 2009. A partir do leite de cabra geneticamente alterado é possível produzir a antitrombina extra, uma proteína que age como um afinador natural do sangue (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009). O elevado custo de manutenção dos animais e o período de tempo necessário para avaliar o nível de produção são alguns dos pontos negativos.

A utilização de plantas transgênicas para a produção de proteínas é muito mais seguro, apresenta menos problemas de armazenamento e distribuição, requer menos tempo e custo em comparação com os sistemas de animais vivos e de culturas de células animais. O uso de vegetais evita gastos com purificação de potenciais organismos responsáveis por doenças em humanos, apresenta estabilidade oferecendo vantagens de estocagem e transporte (RECH, 2004).

A provável contaminação por pesticidas, herbicidas e metabólitos de plantas tóxicas são o inconveniente deste sistema (FITZGERALD, 2003). O FDA aprovou em 2012 o primeiro medicamento a partir de cenoura geneticamente modificada para tratamento da doença de Gaucher do tipo I, denominado Elelyson® (taliglucerase alfa) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

4. CONCLUSÃO

A produção de uma proteína recombinante pode ser obtida tanto em organismos procariotos como em eucariotos. A biotecnologia é uma ciência de interesse industrial, por isso, pesquisas desejam alcançar níveis satisfatórios de produção, pois diferentes genes requerem investimentos e tentativas específicas, com protocolos de indução distintos. Para obter uma eficiente expressão de proteínas recombinantes é necessário a escolha de uma célula hospedeira de expressão estável, a transcrição, a tradução, o processamento proteico e o desenvolvimento de um processo de recuperação eficiente.

5. REFERÊNCIAS

BIRCH, J.R; RACHER, A.J. Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 58, p. 671-685, 2006.

CELIK, E; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1108-1118, 2012.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 297-306, 2009.

EXAME. As cem empresas que mais investiram em pesquisa em 2013. 19 nov 2013. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/negocios/noticias/as-cem-empresas-que-maisinvestiram-em-p-d-em-2013>>. Acesso em 29 jun 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Approval Letter – Atryn. 06 fev 2009. Disponível em: <<<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm134046.htm>>>. Acesso em 06 jul 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves new orphan drug to treat a form of Gaucher disease. 01 mai 2012. Disponível em:<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302549.htm>>. Acesso em 07 jul 2015.

RECH, E. Dos vegetais emerge uma nova fonte de substâncias terapêuticas. *Biotechnology*, n. 1, 2004.

REIS, C. et al., Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria

farmacêutica. BNDES Setorial: Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, 2009.

SORENSEN, H.P., et al. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 115, p. 113–128, 2005.

ZHANG L, et al. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 923-929, 2011.

CAPÍTULO XIV

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE BIOFÁRMACOS PARA A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Ludmila de Araújo Costa¹

Douglas Carvalho Francisco Viana²

César Augusto Souza de Andrade³

¹Uninovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Departamento de Bioquímica, UFPE

E-mail de contato:ludimila_dearaujo@hotmail.com

RESUMO –*A nanotecnologia tem sido aplicada em diversos setores da indústria farmacêutica, incluindo o desenvolvimento dos sistemas para entrega de drogas (drug delivery systems). Estes sistemas funcionam por meio da utilização das nanopartículas como transportadores, os quais carregam de forma compartimentalizada substâncias ativas com propriedades terapêuticas, direcionando-as para sítios específicos onde deverão exercer os efeitos farmacológicos desejados. Os biofármacos tem se mostrado mais eficazes que os medicamentos*

convencionais obtidos por processos de origem química, possibilitando o tratamento de doenças crônicas nas quais há a ausência, diminuição ou perda de função de uma determinada proteína. Desta forma, o presente trabalho se baseia na análise da importância dos aspectos dos sistemas de carregamento e liberação controlada de biofármacos os quais apontam para a nova era de produção de medicamentos, consistindo na criação de drogas mais específicas, com menor toxicidade e com possibilidade de utilização em diferentes vias de administração. A pesquisa foi realizada a partir do levantamento bibliográfico do tema sugerido através de dados encontrados na literatura científica por meio da busca de artigos em bancos de dados eletrônicos, como Science Direct, PubMed, Scielo, Web of Science. Em detrimento aos diversos nanossistemas existentes, este trabalho teve como enfoque destacar as características dos sistemas de entrega de drogas orgânicos, com ênfase ao uso dos lipossomas, as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, os dendrímeros e as micelas poliméricas devido a sua maior biocompatibilidade.

Palavras chave: Nanopartículas, Indústria farmacêutica, Sistemas de liberação de drogas.

1. INTRODUÇÃO

Nanotecnologia pode ser definida como a aplicação tecnológica de objetos que possuam, no

mínimo, uma de suas dimensões físicas medindo entre 0,1 e 100 nanômetros (INSTITUTO INOVAÇÃO, 2005). Dentro da indústria farmacêutica, a nanotecnologia tem sido aplicada em diversos setores, incluindo o desenvolvimento dos sistemas para entrega de drogas (drug delivery systems). Estes sistemas funcionam por meio da utilização das nanopartículas como transportadores, os quais carregam de forma compartimentalizada substâncias ativas com propriedades terapêuticas, direcionando-as para sítios específicos onde deverão exercer os efeitos farmacológicos desejados. O seu uso tem propiciado maior controle da velocidade de liberação de substâncias e ainda oferece a vantagem de não causarem alterações na estrutura química da molécula transportada (OLIVEIRA, et al., 2004).

Os biofármacos são caracterizados como medicamentos produzidos por técnicas biotecnológicas com a utilização de um sistema vivo. Podem ser extraídos de órgãos e tecidos, microrganismo, fluidos animais ou a partir de células e microrganismos modificados geneticamente. Os biofármacos tem se mostrado mais eficazes que os medicamentos convencionais obtidos por processos de origem química, possibilitando o tratamento de doenças crônicas nas quais há a ausência, diminuição ou perda de função de uma determinada proteína (CARREIRA et al., 2013), algo que tem parecido ser bastante promissor.

Estima-se que até o fim do ano de 2015 o mercado mundial gaste cerca de 1,1 trilhões de dólares com

produtos provenientes das indústrias farmacêuticas, podendo atingir aproximadamente 1,3 trilhões de dólares em 2018 (IMS HEALTH MARKET PROGNOSIS, 2014). Assim como em outros mercados, houve o crescimento da competição no setor farmacêutico, principalmente devido aos avanços na área de biotecnologia e engenharia genética, os quais têm proporcionado à elevação dos gastos em P&D (MAGALHÃES, 2003). Parte desses investimentos tem sido direcionados a nanomedicina, ciência relacionada ao desenvolvimento, à caracterização e à aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica (TORCHILIN, 2006; YANG, 2008 apud GARCIA, 2014).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o atual cenário para o desenvolvimento e aplicação dos principais sistemas para a entrega que podem ser utilizados na produção industrial de biofármacos. O presente trabalho se baseia na análise da importância dos aspectos dos sistemas de carregamento e liberação controlada de fármacos os quais apontam para a nova era de produção de medicamentos, consistindo na criação de drogas mais específicas, com menor toxicidade e com possibilidade de utilização em diferentes vias de administração. Portanto, resultando na criação de novas e mais eficazes terapias viáveis a indústria farmacêutica, pois permitem a vetorização de relevantes biomoléculas, como proteínas, material genético e vacinas, a depender do tipo de nanopartícula utilizada (ROSSI – BERGMANN, 2008).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada a partir do levantamento bibliográfico do tema sugerido através de dados encontrados na literatura científica por meio da busca de artigos em bancos de dados eletrônicos, como Science Direct, PubMed, Scielo, Web of Science, caracterizando-se, portanto, como descritiva referencial teórica. As palavras chave serão: biofármacos, nanopartículas, indústria farmacêutica, sistemas de liberação de drogas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nanosistemas de entrega das drogas têm sido idealizados de maneira a representarem dois importantes características: entrega dose-controlada e sítio-específica (RANGHAR, 2014). As nanopartículas, são absorvidas pelas células de forma mais eficiente do que outras micromoléculas maiores e, por conseguinte, podem ser usadas como sistemas de transporte e de distribuição eficazes. Nanossistemas diferentes composições e propriedades biológicas têm sido amplamente estudados para aplicações de entrega de drogas e genes (PISON, 2006; BRANNON-PEPPASE, 2004; STYLIOS, 2005; YOKOYAMA, 2005; SCHATZLEING, 2006 apud SURI, 2007)

Os sistemas de entrega de drogas têm sido bastante utilizados para o encapsulamento de biofármacos e medicamentos convencionais com o intuito de controlar a quantidade liberada no organismo e, assim, melhorar a eficácia terapêutica (SHAFFER, 2005). O uso desses sistemas de liberação controlada pode trazer inúmeros benefícios, como proteção contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo a manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante; aumento da eficácia terapêutica; liberação progressiva e controlada pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); diminuição significativa da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; redução da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis; possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade); incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas nos dispositivos; diminuição da dose terapêutica e do número de administrações, além do aumento da aceitação da terapia pelo paciente (PIMENTEL, 2007).

Algumas desvantagens também podem ser listadas, como por exemplo, uma possível toxicidade dos produtos da sua biodegradação e custo mais elevado de produção a depender do material e do processo utilizado. Entretanto, estes aspectos podem ser contornados pela redução das doses necessárias (ROSSI – BERGMANN, 2008). Além dos benefícios oferecidos nas terapias, o uso das nanopartículas dentro dos sistemas de entrega de drogas em escala industrial ainda proporcionam

excelentes perspectivas econômicas, como redução de matérias-primas, do consumo energético de importantes processos industriais, menos agressão ao meio ambiente e maior proteção à saúde do consumidor (SILVA, 2003).

Maiores esforços no intuito de desenvolver os sistemas de carregamento e liberação começaram por volta da década de 1980 e até então muito ainda tende a ser debatido no meio científico a fim de criar novos sistemas e aperfeiçoar os já existentes. Atualmente, as principais pesquisas têm concentrado a maior parte de seus recursos no melhor entendimento sobre a dinâmica das nanopartículas (RAMOS & PASA, 2008), aspecto bastante relevante para a indústria farmacêutica, pois o conhecimento agregado pode auxiliar na escolha da nanopartícula adequada a produção de determinado produto de modo a garantir mais eficácia e maior rentabilidade.

Em detrimento aos diversos nanossistemas existentes até os dias atuais, este trabalho terá como enfoque destacar as características dos sistemas de entrega de drogas orgânicos, com ênfase aos mostrados no quadro 1 devido a sua maior biocompatibilidade (BAMRUNGSAP, 2012).

Quadro 1 - Breve descrição de nanossistemas.

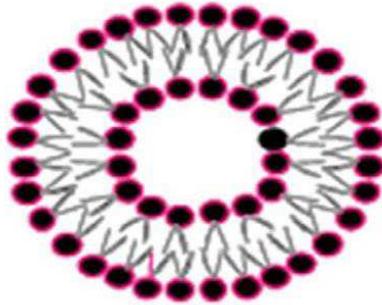
Nanossistemas	Tamanho	Características	Aplicações
Lipossomas	50 - 100 nm	Biocompatíveis, biodegradáveis, boa capacidade de retenção e liberação controlada do conteúdo encapsulado por difusão e/ou por erosão da vesícula	
Nanopartículas poliméricas	10-1000 nm	Biocompatíveis, biodegradáveis, não imunogênicas, atóxicas; oferecem completa proteção ao fármaco	Excelente sistema de transporte para entrega de doses constantes e controladas.
Nanopartículas lipídicas	1 – 10 nm	Biocompatíveis, biodegradáveis, promovem o aumento da estabilidade da droga, boa tolerabilidade, biodisponibilidade e reprodutibilidade em larga escala	Transporte de fármacos Lipofílicos, largo espectro de vias de administração: intravenosa, intramuscular, parenteral, oral, oftálmica e tópica.
Dendrimeros	1 a 10 nm	Controle do peso molecular e forma, baixo índice de polidispersidade, boa retenção e área de superfície; alta solubilidade, miscibilidade e reatividade.	Para longos períodos de circulação, entrega controlada de bioativos, direcionamento para o fígado.
Micelas Poliméricas	10 – 100 nm	Elevada capacidade de carregamento, versatilidade, estabilidade em condições fisiológicas, taxa de dissolução mais lenta, alta acumulação do biofármaco/droga no local-alvo	Para longos períodos circulatórios, entrega ativa e passiva de drogas sítio-específica, valor diagnóstico
		mais lenta, alta acumulação do biofármaco/droga no local-alvo	valor diagnóstico

Fonte: NAHAR *et al*, 2006 (adaptado)

Lipossomas: Vesículas artificiais que se organizam espontaneamente as quais são desenvolvidas a partir de fosfolipídios anfifílicos. Consistem de uma estrutura com uma ou várias bicamadas concêntricas em torno de um domínio de núcleo aquoso, com tamanho variável entre 50 e 100 nanômetros (BAMRUNGSAP, et al., 2012).

Os lipossomas têm propriedades biológicas atrativas, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, o isolamento do medicamento/biofármaco do meio externo, boa capacidade de retenção e liberação controlada do conteúdo encapsulado por difusão e/ou por erosão da vesícula (ALVES, 2004), tanto de compostos hidrofílicos quanto hidrofóbicos (BAMRUNGSAP, S. et al, 2012). Através da adição de agentes na membrana lipídica ou da alteração da composição química de sua superfície, as propriedades dos lipossomas, tais como tamanho, carga de superfície e funcionalidade, podem ser facilmente ajustadas para a finalidade pretendida (BAMRUNGSAP, et al., 2012).

Figura 1- Representação esquemática de um lipossoma.



Fonte: BUTSELE, 2007 apud SAFARI, 2014

O tamanho dos lipossomos pode variar de vesículas muito pequenas ($0,025 \mu\text{m}$) a grandes ($2,5 \mu\text{m}$), apresentando uma ou múltiplas bicamadas. De acordo com o tamanho e o número de bicamadas, são classificados em:

- Vesículas Multilamelares (Multilamellar Large Vesicles - MLV);
- Vesículas Unilamelares Grandes (Large Unilamellar Vesicles - LUV);

- Vesículas Unilamelares Pequenas (Small unilamellar vesicles – SUV).(FIALHO & CUNHA JR, 2007).

Até então, os lipossomas representa o sistema melhor estabelecidos clinicamente para administração de fármacos. A sua eficácia foi demonstrada ao reduzir os efeitos sistêmicos e toxicidade, bem como na atenuação da eliminação da droga (BLUME, 1990; TORCHILIN, 2005 apud BAMRUNGSAP, 2012). Lipossomas modificados em nanoescala demonstram excelentes perfis farmacocinéticos para a entrega de moléculas de DNA, oligonucleótidos anti-sense, pequenos RNAs de interferência (siRNAs), proteínas e agentes quimioterapêuticos (BAMRUNGSAP, 2012).

Algumas limitações estão associadas a este sistema, incluindo a baixa eficiência de encapsulamento, rápida liberação das drogas, pobre estabilidade de armazenamento e a ausência de gatilhos sintonizáveis para liberação da droga (BAMRUNGSAP, 2012). A via oral é uma via de administração preferencial, porém é dificultada pelas condições agressivas do trato gastrointestinal, como baixo pH estomacal, presença de enzimas degradativas e ação detergente dos sais biliares no intestino (MATOS, & MOUTINHO, 2008 apud FAHANING & LOBÃO). Além disso, uma vez que os lipossomas normalmente não podem permear células, as drogas são liberadas no fluido extracelular (LAVERMAN, 2001 apud BAMRUNGSAP, 2012). A melhora dos sistemas tem se baseado em processos de modificação de sua superfície no sentido de conferir

maior estabilidade e integridade estrutural contra o microambiente oral ou parenteral após a sua administração (SIHOKAR &.VYAS, 2001).

a. **Nanopartículas Poliméricas:** Partículas coloidais com tamanho variável entre 10-1000 nm. Podem ser esféricas, estruturas ramificadas ou com núcleo e camadas. Têm sido fabricados utilizando polímeros sintéticos biodegradáveis, tais como copolímeros de polilactida -poliglicólido, poliacrilatos e policaprolactonas, ou polímeros naturais, tais como albumina, gelatina, alginato, colágeno e quitosana (PANYAM &LABHASETWAR, 2003 apud BAMRUNGSAP, 2012).

Enquadrados nesta categoria temos dois tipos diferentes de estruturas:

- **Nanoesferas:** fármaco/biofármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado; não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido;
- **Nanocápsulas:** a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. São sistemas do tipo reservatório onde é possível se identificar um núcleo diferenciado, sólido ou líquido; constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica.(AZEVEDO, 2002; SCHAFFAZICK, 2003).

Estes sistemas agem como compartimentos transportadores de substâncias com boa estabilidade física, química e biológica, fácil preparação e boa reprodutibilidade, além de serem aplicáveis a uma ampla variedade de substâncias visando melhorar suas propriedades químicas (FAHANING & LOBÃO).

Avanços científicos e tecnológicos têm resultado no desenvolvimento de polímeros inteligentes ou sensíveis a estímulos, os quais podem alterar as suas propriedades físico-químicas a depender de sinais ambientais externos, tais como fatores físicos (temperatura, ondas de ultrassom, luz, eletricidade, estresse mecânico), químicos (pH e força iônica) e biológicos (enzimas e biomoléculas). A versatilidade de fontes para a síntese desses polímeros e a sua fácil combinação torna possível melhorar a sua sensibilidade em resposta a um dado estímulo dentro de um intervalo estreito, algo que leva a uma entrega mais precisa de droga (BAMRUNGSAP, 2012).

Esses sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica (FAHANING & LOBÃO, 2011). Os biopolímeros como a quitosana e albumina têm a vantagem de terem custo bem mais baixo que os sintéticos, podendo ser mais econômicos (ROSSI-BERGMANN, 2008).

3.3 Nanopartículas Lipídicas

São compostas por um núcleo sólido coberto por uma camada de moléculas de agentes tensoativos (MARQUES, 2010). Os lipídios utilizados em sua são triglicéridos, mistura de glicéridos ou ceras. Esses ingredientes são bem toleráveis fisiologicamente e aprovados para aplicações farmacêuticas em humanos (FAHANING & LOBÃO, 2011).

As nanopartículas lipídicas são caracterizadas segundo diversos critérios, como carga superficial (Potencial Zeta), tamanho e polidispersidade, morfologia, ponto de fusão, estruturas cristalinas, características de material congelado, eficiência de encapsulação e capacidade de ligação do biofármaco droga (TOMAZZINI, 2007). Por suas características, este carreador passou a ser utilizado no transporte de fármacos lipofílicos, apresentando um largo espectro de vias de administração: aplicação intravenosa e intramuscular, parenteral, oral, oftálmica e tópica (MARCATO, 2009).

As vantagens desse sistema consistem na promoção de uma liberação sustentada e/ou direcionada para um alvo específico, permanência mais duradoura na corrente sanguínea, capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica sem danificar estruturas, muitas vezes promovem o aumento da estabilidade da droga, boa tolerabilidade e biodisponibilidade após administração oral, e alta reprodutibilidade em larga escala (TOMAZZINI, 2007).

Dentre as desvantagens temos sua baixa capacidade de encapsulamento (em torno de 25-50% dependendo da solubilidade do ativo na matriz lipídica, do método utilizado e do estado polimórfico da matriz lipídica). A utilização de lipídios muito semelhantes gera cristais perfeitos. Como o fármaco se localiza entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos cristais diminui a eficiência de encapsulamento (MARCATO, 2009).

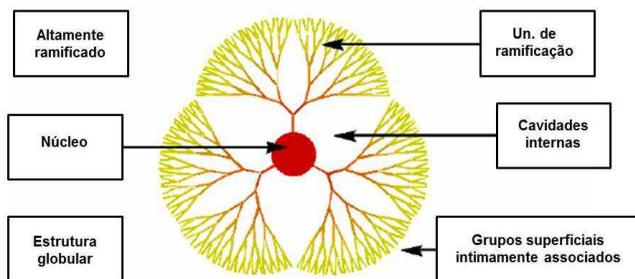
3.4 Dendrímeros:

Estruturas altamente ramificadas, simétricas e que tendem a ter forma de esfera, com tamanho variável entre 1 a 10 nm (SANTOS, 2008; ROSSI- BERGMANN, 2008). De maneira geral, lembram uma árvore com muitos galhos ramificados (JAIN, 2007) por serem um núcleo ligado aos seus ramos (SANTOS, 2008; ROSSI- BERGMANN, 2008). Diferenciam-se dos polímeros clássicos devido às suas ramificações serem altamente regulares e a macromolécula ser bastante simétrica (Figura 2) (SANTOS, 2008).

Apresentam três diferentes regiões: núcleo, ramos e superfície. Os constituintes macromoleculares irradiam em forma de ramificações a partir do núcleo central, criando uma cavidade interna e uma esfera de grupos terminais as quais podem ser adaptadas de acordo com a finalidade pretendida. Neste sentido, podem ser modificados de maneira a gerarem compostos de baixa toxicidade e alta biopermeabilidade. Desta forma, detêm propriedades promissoras para a entrega de bioativos, tais

como medicamentos, vacinas, metais e genes, até os locais desejados (JAIN, 2007).

Figura 2 - Representação esquemática de um dendrímero mostrando núcleo, ramificações e superfície.



Fonte: JAIN, 2007 (adaptado)

Os dendrímeros são considerados ótimos sistemas carreadores de drogas por fatores como:

- Tamanho (1-10nm), por ser viável sintetizar esses sistemas com peso molecular definido;
- Formação de estruturas concêntricas;
- Controle do peso molecular e forma (permite a síntese de micelas unimoleculares);
- Baixo índice de polidispersidade (razão entre o peso molecular médio ponderado e o número do peso molecular médio do polímero);
- Boa retenção e área de superfície;

- Alta solubilidade, miscibilidade e reatividade (presença de diversascadeias terminais). Dendrímeros com grupos terminais hidrofílicos são solúveis em solventes polares e aqueles com grupos terminais hidrofóbicos, são solúveis em solventes apolares;
- Capacidade de encapsulamento de moléculas na macromolécula interior e a presença de cavidades internas (JAIN, 2007; ROSSI-BERGMANN, 2008).

Além de serem utilizados como sistemas de entrega de drogas, também têm sido bastante utilizados em processos de solubilização, terapia gênica, em imunoenaios e agentes de contraste na ressonância magnética (JAIN, 2007).

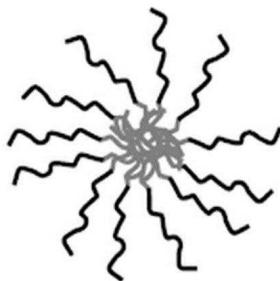
3.5 Micelas poliméricas:

Formadas quando surfactantes anfílicos ou moléculas poliméricas associam-se espontaneamente no meio aquoso de modo a formar estruturas de núcleo-revestimento, medindo < 100 nm. O núcleo de uma micela, hidrofóbico, é rodeado por um invólucro de polímeros hidrofílicos (NISHIYAMA, 2006 apud BAMRUNGSAP, 2012). Este serve como um reservatório para substâncias anfílicas pouco solúveis em água e, concomitantemente, a sua camada hidrofílica estabiliza a região central, prolongando o tempo de circulação no sangue (Figura 3) (GABIZON, 2003 apud BAMRUNGSAP, 2012).

Estes sistemas são bastante dinâmicos, podendo carrear moléculas ou presas fisicamente dentro dos núcleos hidrofóbicos ou ligadas covalentemente a outras moléculas que compõem a micela. Dentre as vantagens

quando utilizadas como transportadores de substâncias têm-se à elevada capacidade de carregamento e versatilidade, a estabilidade em condições fisiológicas, a taxa de dissolução mais lenta, a alta acumulação do biofármaco/droga no local-alvo e possibilidade de funcionalização do grupo terminal para conjugação de ligantes de direcionamento (JAIN, 2007).

Figura 3 - Representação esquemática de uma micela polimérica.



Fonte: SAFARI, 2014

3.6 Aspectos de extrema relevância para os sistemas de entrega de drogas:

Para garantir a eficácia desses sistemas, os nanocarreadores devem, no mínimo, serem capazes de permanecer um período de circulação adequado para que a biomolécula não seja eliminada antes de atingir o seu alvo. Dessa forma, características como tamanho, forma

e superfícies têm sido apontadas como cruciais para a sua eficiência (BAMRUNGSAP, 2012).

- **Tamanho e forma.** O tamanho está relacionado com o grau de degradação, a dinâmica vascular, direcionamento, a depuração, além da velocidade, das características de difusão e das propriedades de aderência, que estão relacionadas aos mecanismos de absorção (CHAMPION, 2007; PATIL, 2001; NEL, 2009; ZAUNER, 2001; YAMAMOTO, 2002; apud BAMRUNGSAP, 2012): a dimensão dos sistemas deve ser grande o bastante para evitar uma rápida fuga nos capilares sanguíneos, e ao mesmo tempo, suficientemente pequena para escapar do processo de captura por parte dos macrófagos através do sistema reticuloendotelial, tais como o fígado e baço. A forma, por sua vez, parece influenciar nos processos de internalização, transporte nos vasos sanguíneos e na marcação dos sítios-alvo da (CHAMPION, 2006; GENG, 2007; GRATTON, 2008 apud BAMRUNGSAP, 2012).

- **Superfície.** Parece influenciar diretamente no tempo de vida de circulação na corrente sanguínea das nanopartículas. Para tanto, o revestimento com moléculas de polímeros hidrofílicos tem sido utilizado como estratégia para driblar a limitação (MOGHIMI, 2001). A carga presente na superfície da partícula também parece influenciar funções como a internalização por macrófagos: partículas positivamente carregadas foram parecem exibir maior internalização por macrófagos e células dendríticas em comparação com as partículas neutras ou carregadas negativamente (THIELE, 2003).

O potencial em mudar a forma de tratar doenças baseado em nanomateriais demonstra grande capacidade

em reduzir a dose do biofármacoelemento para conseguir o benefício terapêutico, o qual, por sua vez, leva a diminuição de custos e/ou dos efeitos colaterais associados com certas substâncias (BAMRUNGSAP, 2012), apesar da subsistência de desafios ainda significativos neste campo para a criação de terapias clinicamente viáveis (SAFARI, 2014).

4. CONCLUSÃO

A evolução da nanotecnologia demonstra que essa ciência muito em breve assumirá um lugar essencial no progresso tecnológico de modo geral, em particular dentro da indústria farmacêutica, principalmente devido ao desenvolvimento dos sistemas de entrega de drogas para a terapêutica humana. Embora classificado como emergente nos dias atuais, esses sistemas mostram um futuro bastante promissor.

Este potencial em mudar a forma de tratar doenças baseado em nanomateriais demonstra grande capacidade em reduzir a dose do biofármacoelemento para conseguir o benefício terapêutico, o qual, por sua vez, leva a diminuição de custos e/ou dos efeitos colaterais associados com certas substâncias, apesar da subsistência de desafios ainda significativos neste campo para a criação de terapias clinicamente viáveis.

Diante do exposto, espera-se que essa revisão tenha contribuído para o detalhamento sobre os sistemas de carregamento e liberação controlada de biofármacos

com base na revisão bibliográfica dos mais recentes e importantes artigos científicos da área.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. *Parcerias Estratégicas*, Brasília, n. 18, p. 23-40, 2004.

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. In. *Workshop Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico*, São Paulo. 2002.

BAMRUNGSAP, S; ZHAO, ZILONG; CHEN, Tao; WANG, L; CHUNMEI, L; FU, T; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*. v. 7, n 8, p. 1253–1271, 2012.

BLUME, G; CEVC, G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v. 1029, n 1, p. 91–97, 1990.

BRANNON-PEPPAS, L; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Systems Reviews*. v. 56, n 11, p.1649-1659, 2004.

CARREIRA, A. C. O; LEVIN, G; COELHO, T. M; BELCHIOR, G. G; SOGOVAR, M. C. Biofármacos: sua

importância e as técnicas utilizadas em sua produção. *Genética na Escola*, v.8, n. 2, 2013.

CHAMPION, J. A.; MITRAGORI, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 103, n 13, p. 4930–4934, 2006.

CHAMPION, J. A.; KATARE, YOGESH K.; MITRAGOTRI, S. Particle shape: a new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. v. 121, n 0, p. 3–9, 2007..

GABIZON, A; HOROWITZ, A T.; GOREN, D; TZEMACH, D; SHMEEDA, H; ZALIPSKY, S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research*, v. 9, n. 17, p. 6551– 6559, 2003..

GARCIA, F. M. Nanomedicine and therapy of lung diseases. *Einstein*, v. 12, n 4, p. 531-533, 2014..

GENG, Y; DALHAIMER, P; DISCHER, D. E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature Nanotechnology*, v. 2, n 4, p. 249–255, 2007..

GRATTON, S; ROOP, P. A.; DESIMONE, J. M. The effect of particle design on cellular internalization pathways. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n 33, p. 11613-11618, 2008.

INSTITUTO INOVAÇÃO. Nanotecnologia. 2005. Disponível em: <www.institutoinovacao.com.br/downloads/inovacao_set05.pdf>. Acesso em 08 de janeiro de 2015.

JAIN, N.K. Pharmaceutical Nanotechnology, 2007.

LAVERMAN, P; CARSTENS, M. G.; BOERMAN, O. C. et al. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 298, n 2, p. 607–612, 2001.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. Revista eletrônica de farmácia, Campinas – SP, v.6, n 2, p. 01 – 37, 2009. Disponível em: < www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/6545>. Acesso em 10 de julho de 2015.

MARQUES, C. P. Formas farmacêuticas contendo nanopartículas lipídicas. Monografia (Grau de licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde, Porto, 2010.

MATOS, C. M.; MOUTINHO, C. G. Interação de fármacos com lipossomas: áreas de aplicação. Revista da

Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, n. 5, p.182-191, 2008.

NEL, A.E.; MADLER, Lutz; VELEGOL, Darrell et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Natural Materials*, v. 8, n.7, p. 543–557, 2009.

NISHIYAMA, N; KATAOKA, K. Current state achievements and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology&Therapeutics*, v. 112, n. 3, p. 630–648, 2006.

OLIVEIRA. A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A; CERA, L. F. R; FORMARIZ, T. P. Microcroemulsões: estrutura e aplicações como sistemas de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

PANYAM, J; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 3, p. 329–347, 2003.

PATIL, V. R. S; CAMPBELL, C. J.; YUN, Y. H.; SLACK, S. M.; GOETZ, D. J. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, v. 80, n. 4, p. 1733–1743, 2001.

PIMENTEL, L. F; JÁCOME, A. T. J; MOSQUEIRAL, V. C. F; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da

malária. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, v. 43, n. 4, 2007.

PISON, U; WELTE, T; GIERSING, M; GRONEBERG, D A. Nanomedicine for respiratory diseases. European Journal of Pharmacology, v. 533, n 1, p. 341-350, 2006.

RAMOS, B G Z; PASA, T. B. C. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. Revista Brasileira de Farmácia, n. 89, p.95- 101, 2008.

RANGHAR, S; SIHORI, P; VERMA, P; AGARWAL, V. Nanoparticle-based Drug Delivery Systems: Promising Approaches Against Infections. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.57, n. 2, p. 209-222, 2014..

SAFARI, J. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design - a review. Zohre Zarnegar Journal of Saudi Chemical Society, v.18, p. 85– 99, 2014.

SANTOS, A. N. Aspectos bioeletroquímicos de dendrímeros como nanoplataformas para aplicações clínicas. Minas Gerais, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, 2008.

SCHATZLEIN, A. G. Delivering cancer stem cell therapies – a role for nanomedicines? European Journal of Cancer, v. 42, n.9, p. 1309-1315, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricosnanoparticulados para administração de fármacos. Química Nova, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAFFER, C. Nanomedicine transforms drug delivery. Drug Discovery Today, v. 10, p. 1581-1582, 2005.

SILVA, C. G. O Programa Nacional de Nanotecnologia e o Centro Nacional de Referência em Nanotecnologia.2003.Disponível em: <http://nanotecnologiaplicada.files.wordpress.com/2009/04/programanano_a.pdf>. Acessado em 06 de janeiro de 2015.

STYLIOS, G. K.;GINNOUDIS, P. V. et al. Applications of nanotechnologies in medical practice. Injury, v. 36 p. 6-13, 2005.

THIELE, Lars, MERKLE, Hans P.; WALTER, Elke. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. PharmaceuticalResearch, v. 20, n. 2, p. 221–228, 2003.

TOMAZZINI, F; DURAN, M; VAUGHN, N. Nanopartículaslipídicasólidas em fármacos. Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química.2007.

TORCHILIN, V. P. Recentadvanceswithliposomes as pharmaceuticalcarriers. Nature Reviews Drug Discovery, v.4, n. 2, p. 145-60, 2005.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n; 14, p.1532-55, 2006.

YAMAMOTO, N; FUMIO, F; OHSHIMA, H. et al. Dependence of the phagocytic uptake of polystyrene microspheres by differentiated HL60 upon the size and surface properties of microspheres. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, v. 25, p. 157–162, 2002.

YANG, W; PETERS, J. I.; WILLIAMS, R. O. Inhaled nanoparticles - a current review. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 356, n.1-2, p.239-47, 2008.

YOKOYAMA, M. Drug targeting with nano-sized carrier systems. *Journal of Artificial Organs*, v. 8, n. 2, p. 77-84, 2005.

ZAUNER, W; FARROW, N. A.; HAINES, A. M.R. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *Journal of Controlled Release*, v. 71, n.1, p. 39–51, 2001.

CAPÍTULO XV

CITOTOXICIDADE DE SURFACTANTES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Maria Andreza Bezerra Correia¹

Thiago Ubiratan Lins e Lins²

Vitor Alfredo de Santana Silva²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

Cristina Maria Souza-Motta³

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco

²Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

³Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências,
Laboratório de taxonomia e sistemáticas de fungos

E-mail para contato: marandrezabcorreia@yahoo.com.br

RESUMO- *Os surfactantes nas indústrias farmacêuticas são utilizados como excipientes em sistemas de liberação de fármacos com base em suas propriedades de formar*

monocamadas, emulsões e dispersões de óleo-em-água ou água-em-óleo. Com o intuito de investigar as possíveis aplicações dos surfactantes pelas indústrias farmacêuticas um levantamento na literatura foi realizado. Uma ampla gama de sistemas de liberação de fármacos coloidais estão disponíveis comercialmente e em fase de pesquisa clínica utilizando surfactantes químicos, no entanto ainda é escassa pesquisas utilizando surfactantes biológicos em formulações farmacêuticas.

Palavraa Chave: biosurfactante, sistemas de liberação de fármacos coloidais, indústria farmacêutica.

1. INTRODUÇÃO

Formulações farmacêuticas e os sistemas de liberação de fármacos

Historicamente o propósito básico do desenvolvimento da terapia medicamentosa é de promover a ação da droga no local com a concentração exigida. No entanto a distribuição de um fármaco dentro do corpo é determinada por suas propriedades físico-químicas. A penetração de drogas em órgãos, tecidos e células saudáveis leva a condução da toxicidade e com isso a necessidade da criação de estratégias para melhorar a seletividade de uma molécula ativa em seu local de ação. Para isso, as moléculas ativas necessitam de um sistema transportador que as conduzam e possa mantê-las em

contato íntimo, com o alvo de forma controlada (COUVREUR et al., 2002).

As formulações farmacêuticas são constituídas, em geral, do fármaco que constitui o princípio ativo do medicamento e de excipientes (ANSEL; LLOYD; POPOVICH, 2013). Os excipientes são substâncias, por definição, destituídas de poder terapêutico. São constituídos de materiais quimicamente heterogêneos, utilizados para assegurar a estabilidade, a eficácia e as propriedades físico-químicas, farmacológicas e organolépticas dos produtos farmacêuticos. Possui como função solubilizar, espessar, suspender, diluir, emulsificar, estabilizar, entre outras. Podem ser utilizados para melhorar a resposta imune da vacina de várias formas: aumentando a velocidade e duração da resposta imune; aumentando a imunogenicidade; modulando a avides, especificidade, distribuição de subclasse de anticorpos. Entretanto, apesar de conceitualmente inertes, não existe ausência de risco comprovado na utilização de excipientes farmacêuticos (ARAÚJO; BORIN, 2012).

Geralmente os excipientes são classificados em particulados e não particulados. Os particulados apresentam partículas microscópicas nas quais o imunógeno está incorporado ou associado, e os não particulados são imunomoduladores que aumentam a resposta imune e podem ser associados ao primeiro. Entre os excipientes particulados destacam-se os derivados de alumínio, as emulsões do tipo água-em-óleo, emulsões do tipo óleo-em-água e as emulsões múltiplas,

lipossomas, micro e nanopartículas (COX; COULTER, 1997; ARAÚJO; BORIN, 2012).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os excipientes contendo agentes surfactantes/tensoativos/emulsificantes são utilizados para estabilizar formulações que possuem um líquido disperso no interior de outro líquido com ele imiscível. Por serem substâncias que reduzem a tensão superficial e a tensão interfacial, podem ser utilizados como agente molhante, detergente ou emulsificante.

O uso mais comum de surfactantes nas indústrias farmacêuticas é em sistemas de liberação de fármacos com base suas propriedades em formar monocamadas, emulsões e dispersões de óleo-em-água ou água-em-óleo (BHADORIYA, 2013). Os sistemas de liberação de fármacos coloidal (SLFC) consistem em partículas com diâmetro de 10-400 nm e se mostram como uma grande promessa como sistema de liberação de droga. Dois tipos principais de SLFC estão disponíveis: (1) o sistema de liberação de fármacos coloidais vesiculares (SLFCV), (2) o sistema de liberação de fármacos coloidais particulares (SLFCP) (GARG, RATH, GOYAL, 2015).

Os SLFCV são organizados em bicamadas lipídicas concêntricas formando estruturas anfifílicas expostas a água. Tem como vantagem o prolongamento da droga na circulação, redução da toxicidade e biodisponibilidade. Todos os tipos de drogas (hidrofílicas ou lipofílicas) podem ser carregados por este sistema, resolvendo desta forma, o problema de insolubilidade de

drogas, instabilidade e degradação rápida. Os SLFCV são classificados em: lipossomas, niosomas, transferosomas, ethosomas, cubosome, virosomos, fitosomo, microemulsões e emulsões múltiplas.

Os SLFCP são substâncias ativas presentes em pequenas subunidades independentes com tamanho de 0,05 a 2,00 nm. A principal vantagem desse sistema de liberação é a deposição da droga no local alvo, reduzidos efeitos tóxicos para o tecido alvo e o aumento intracelulares da droga. São classificados em: micropartículas, nanopartículas, liposfera, micela, complexos imunoestimulantes, sistema de entrega de drogas auto-emulsionantes, dendrímeros, cochleates e eritrócitos encapsulados(GARG, RATH, GOYAL, 2015).

Aplicações de tensoativos em formulações farmacêuticas

Os surfactantes aplicados em formulações farmacêuticas possuem como principal função melhorar a solubilidade de drogas, estabilizar fármacos encapsulados além de permitir a penetração na membrana celular, pele e outras interfases biológicas (BHADORIYA et al., 2013).As emulsões podem ajudar a solubilizar fármacos lipofílicos e diminuir a instabilidade aquosa, associando-as com uma fase de óleo hidrofóbico proporcionando uma libertação mais lenta do fármaco por conta da natureza de suas partículas gerando um maior tempo de residência para facilitar a fagocitose por células, do que as formulações aquosas. Assim, podem aumentar a eficácia da vacina para as células. A fim de que uma

emulsão torne-se um produto farmacêutico ou um veículo eficaz para vacinas, é essencial que os componentes da emulsão criem uma formulação estável, sem afetar o perfil de segurança do composto ativo (FOX, 2009).

Segundo Araújo (2012) as emulsões comumente usadas como excipientes podem ser:

- Emulsões tipo óleo-em-água: caracterizam-se por microgotículas de óleo estabilizada por surfactantes em uma fase aquosa contínua que apresenta uma liberação lenta de antígenos e promovem uma estimulação duradoura do sistema imune. Um exemplo é o Emulsigen®, usada em vacinas veterinárias;

- Emulsões múltiplas: fase aquosa externa englobando uma fase interna composta de uma emulsão água-em-óleo que permitem a proteção de fármacos encapsulados, e a separação de substâncias incompatíveis;

- Microemulsões: que são dispersões de água-em-óleo, termodinamicamente estáveis, pouco viscosas, transparentes e opticamente isotrópicas, geralmente estabilizadas por um emulsionante e um co-emulsionante que tem a vantagem de solubilizar antígenos hidrofílicos e lipofílicos, melhora na estabilidade e a liberação prolongada.

Os tensoativos catiônicos são os mais tóxicos e têm sido historicamente usados como agentes antimicrobianos, enquanto aniônico são menos tóxicos e são mais ativos contra bactérias Gram positivas do que

Gram negativas, e os não-iônicos são muitas vezes considerados como não tóxico (DALTIM, 2011). Os tensoativos sintéticos, lauril sulfato de sódio e o polissorbato 80, são os tensoativos mais frequentemente utilizados pela United States Pharmacopeia (SILVA; VOLPATO, 2002).

Contudo, mesmo possuindo uma vasta aplicação em produtos farmacêuticos seu uso requer cuidados por conta da sua toxicidade. Baixos níveis de surfactantes (0,5–5,0% p/v) são indicados para serem incluídos no meio de dissolução, de maneira a fornecer melhor relação com as condições *in vivo*. Além disso, os agentes tensoativos podem provocar irritações locais, danos na membrana e morte celular e, por consequência destes fatores, durante os processos de formulação *in vitro* são necessários testes para investigar os efeitos irritativos e de citotoxicidade (SILVA; VOLPATO, 2002).

Os surfactantes não-iônicos mesmo possuindo uma toxicidade menor podem ocasionar irritação gastro intestinal por mudanças reversíveis na permeabilidade do lúmen intestinal. Por esta razão o uso de emulsionantes de origem natural é preferível uma vez que são considerados mais seguros do que os agentes tensoativos sintéticos (GURSOY; BENITA, 2013; SINGH, 2014).

Tabela 1- Sistemas de liberação de fármacos coloidais vesiculares (SLFCV) que aplicam surfactantes em suas formulações e os fármacos e biomoléculas transportados pelo sistema

SLFCV	Surfactantes	Fármacos/biomoléculas
Niosomas	Span 40, 60, 80; Tween 20, 80, 85; surfactante não iônico; Pluronic L64	O resveratrol, fluconazol, acetazolamida, ácido fólico, tartarato de brimonidina, sal de sódio sulfadiazina, cloridrato de metformina, ibuprofeno, glicirrizinato de amônio
Transferosomos	Span 80, Tween 80	Interferon-beta (IFN-β), Ibuprofeno, curcumina, superóxido dismutase
Etosomos	Poloxamer 407	Diclofenaco sódico, Vinpocetine
Cubosomos	Poloxamer 407	Monofosforil-lípido A e imiquimod, Dexametasona, Ciclosporina A

Microemulsão	Triton X-100, Span 80, Tween 20,80, Brij -92	BiotiniladoZnS (sulfeto de zinco), triptólido, Famotidine
Emulsões múltiplas	Span 80, Span 83, Brij 35, água-em óleo-em-água(a/o/a), o/a/o, emulsões múltiplas, polisorbato 80, pluronic F-68	Aciclovir, Aspirina, oligonucleótidos, vitamina C, antígeno do vírus Influenza

Tabela 2- Sistema de liberação de fármacos coloidais particulados (SLFCP) que aplicam surfactantes em suas formulações e os fármacos e biomoléculas transportados pelo sistema

SLFCV	Surfactantes	Fármacos/biomoléculas
Liposfera	Poloxamer 407, Tween 65	Lercanidipina, Piroxicam
Micelas	Poloxamer	Curcumina, paclitaxel
SEDDS	Tween 80, Cremophor RH40, Tween 20, Labrasol, Cremophor EL	Domperidona, indometacina, Berberina, Cloridrato, quercetina, anfotericina B, Fenobarbital, doxetaxel, Lovastatin, indometacina, hidrocortisona

Na classificação dos sistemas de liberação de fármacos proposta por Garg, Rath e Goyal (2015) estão descritos alguns surfactantes químicos utilizados na indústria farmacêutica em drogas comercialmente disponíveis, e em fase de pesquisas clínicas. Na tabela 1 estão descritos os SLFCV e na tabela 2 os SLFCP que aplicam surfactantes em suas formulações e os fármacos e biomoléculas que são transportados pelo sistema.

2. CONCLUSÃO

Os surfactantes químicos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, no entanto a toxicidade é um dos fatores limitantes de sua aplicação. Atualmente os surfactantes biológicos, também chamados de biossurfactantes, ganharam importância na indústria farmacêutica, biomédica, de cosméticos e alimentos, com um alto valor agregado e possuem um potencial de aplicação em substituição aos tensoativos sintéticos, por conta da baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e disponibilidade de matéria-prima. Uma grande quantidade de trabalhos científicos referenciam a baixa toxicidade dos surfactantes biológicos em relação aos químicos, e, por esta razão vem sendo estudados com o propósito de substituição. Como os biossurfactantes encontrassem em fase de pesquisa e seu custo benefício inviabiliza a produção para aplicação em processos que demandem uma alta quantidade do produto, a possibilidade de substituição por surfactantes

químicos na indústria farmacêutica e promissora, porém bastante desafiadora.

3. REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; ALLEN, L.; POPOVICH, N. G. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. São Paulo: Artmed, 2013. 9ª Ed.

ANVISA. Boas práticas de regulatórias. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2558907/Microsoft%2BWord%2B-%2BJustificativa_CP_Excipientes%2B_final_.pdf/380e7fe6-090a-4d14-93cf-ea1128dd0eb8?version=1.0> Acesso em 19 jan. 2017.

ARAÚJO, A. A. F.; BORIN, M. F. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. *Brasília Med*: artigo de revisão. v. 49, p.267-278, 2012.

BHADORIYA, S.S.; MADORIYA, N.; SHUKLA,K.; PARIHAR, M. S. Biosurfactants: A New Pharmaceutical Additive for Solubility Enhancement and Pharmaceutical Development. *Biochemistry pharmacology*. v. 2, p. 1-5, 2013.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *CriticalReviews in TherapeuticDrug Carrier Systems*. v. 19, p. 99-134, 2002.

COX, J.C.; COULTER, A. R. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. v. 15, p. 248-256, 1997.

DALTIN, D. *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. In: DALTIN, D. Introdução e primeiros conceitos. Ed 1. São Paulo: Blucher, 2011. p. 1-43.

FOX, C. B. Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery. *Molecules*, v.14, p.1-27, 2009.

GANRG, T.; RATH, G.; GOYAL, A.K. Colloidal Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v. 32, p. 89-147, 2015.

GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine e Farmacotherapy*. v. 58, p. 173-182, 2004.

SILVA, R. L.; VOLPATO, N. M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 38, p. 163-172, 2002.

SINGH, B.; SARWAR, B.; KHURANA, R. K.; SANDHU, P. S.; KAUR, R.; KATARE, O.P. Recent Advances in Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS). *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. v. 31, p.121-185, 2014.

CAPÍTULO XVI

PARECER TÉCNICO-CIENTÍFICO: EFICÁCIA E SEGURANÇA DO SECUKINUMABE VERSUS INFLIXIMABE NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATÓIDE

Mayara Marques Carneiro da Silva¹

Priscilla Stela Santana de Oliveira²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: may_marques@hotmail.com

RESUMO – *O secukinumabe é um anticorpo monoclonal humano que se liga a citocina pró-inflamatória interleucina-17A (IL-17A). Na medida em que a IL-17 ocupa um papel central na patogênese da artrite reumatóide, drogas biológicas que têm como alvo a IL-17, têm acumulado estudos favoráveis ao uso desta*

tecnologia. O objetivo deste trabalho foi elaborar um Parecer-técnico-científico comparando eficácia e segurança do secukinumabe versus infliximabe no tratamento da artrite reumatoide. Neste intuito foi conduzida uma busca nas bases de dados MedLine via Pubmed, Lilacs e Cochrane de acordo com as diretrizes metodológicas do Ministério da Saúde. Os estudos selecionados para análise apresentaram boa qualidade metodológica, todavia não forneceram evidências diretas d sobre a eficácia e segurança do uso do secukinumabe comparado ao infliximabe.

Palavras chave: IL-17A, artrite reumatóide, ATS

1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide é uma doença inflamatória crônica, de etiologia ainda desconhecida, com caráter sistêmico e progressivo, caracterizada pelo envolvimento simétrico de pequenas e grandes articulações que pode resultar em deformidade articular e incapacidade funcional (FERNANDES et al., 2011).O tratamento combina intervenções educativas, preventivas e não farmacológicas com o tratamento farmacológico e os procedimentos cirúrgicos (COSTA et al., 2015).

As terapias medicamentosas incluem o uso de anti-inflamatórios não hormonais/ não esteróides (AINH/AINE), corticósteróides, drogas imunossupressoras e drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), sendo estas sintéticas ou biológicas

(MOTA et al., 2013). A terapia com DMCD biológicos, também conhecida como alvo-específica, revolucionou a imunoterapia da AR por proporcionar não apenas a diminuição dos sintomas como, em alguns casos, a remissão da doença. No Brasil, encontram-se aprovados para uso na AR os bloqueadores de TNF- α (Etanercept, Adalimumabe, certolizumabe, golimumabe e infliximabe), depletor de linfócito B (rituximabe), bloqueador da co-estimulação (abatacepte) e bloqueador do receptor de IL-6 (tocilizumabe).(MOTA et al., 2013)

O secukinumabe é um anticorpo monoclonal humano que se liga a citocina próinflamatória IL-17A. Nos Estados Unidos e na União Européia, o medicamento foi aprovado para o tratamento da psoríase em placa moderada a grave (SANFORD; MCKEAGE, 2015). Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia e a segurança do secukinumabe versus infliximabe no tratamento de pacientes com artrite reumatoide.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Formulação da pergunta PICO e estratégia de Busca de informação

A ferramenta PICO [P = população, I = intervenção, C = comparador e O = outcome (desfecho)] foi utilizada afim de estruturar a metodologia para a formulação da pergunta condutora. Considerando o objetivo proposto pelo estudo, o “P” correspondeu à

pacientes com AR, o “I” ao grupo de pacientes em uso de secukinumabe, o “C” ao seu respectivo comparador nesta análise, o grupo em uso de infliximabe, e por fim o “O” como o desfecho pretendido, correspondeu à eficácia, baseada na melhora clínica dos pacientes com AR, medida através dos critérios ACR 20, 50 e 70% e, também, da segurança dos tratamentos, avaliada através do surgimento de efeitos adversos.

A busca na literatura por RS e ECR que tivessem como objetivo avaliar a eficácia e segurança dos medicamentos selecionados, utilizados no tratamento da AR, foi realizada no dia 24/05/2015, nas bases de dados MedLine via PubMed, Lilacs e Cochrane.

2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas nesta análise revisões sistemáticas (RS), com ou sem metanálise, e estudos clínicos randomizados (ECR), desde que apresentassem os desfechos de eficácia e segurança definidos durante a formulação da pergunta condutora da pesquisa.

As buscas consideraram estudos realizados em humanos, que avaliaram os pacientes com AR, publicações realizadas nos últimos 5 anos e nos idiomas português e inglês. Estudos comparativos não randomizados, revisões narrativas, publicações em idiomas diferentes do português e do inglês, que avaliaram desfechos menos relevantes aos destacados nesta análise foram excluídas.

2.3 Avaliação da qualidade da evidência

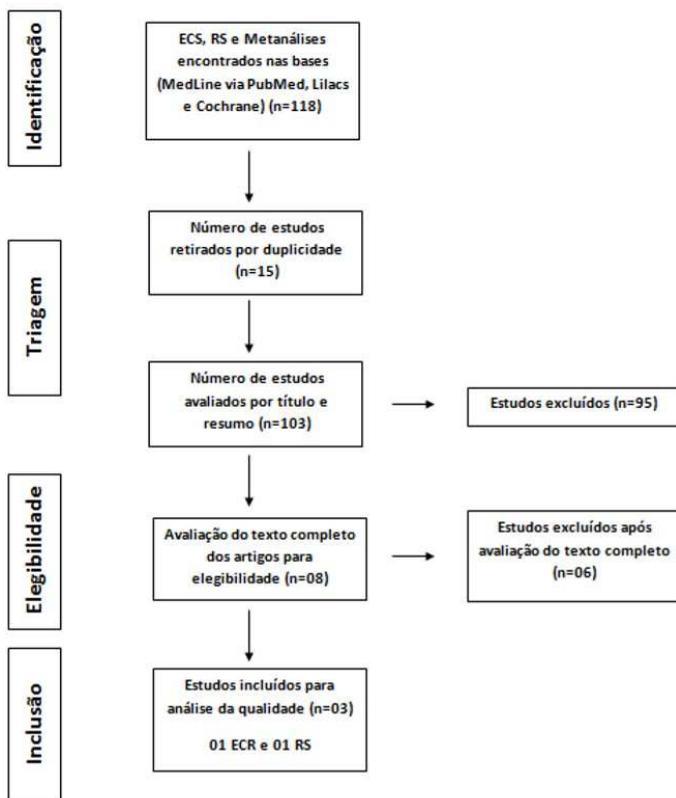
Avaliou-se a qualidade da evidência nos resultados encontrados no estudo clínico selecionado, utilizando a ferramenta de Jadad (JADAD *et al.*, 1996). Para avaliação da qualidade metodológica da RS selecionada foi utilizada a ferramenta de AMSTAR – Assessing the Methodological Quality of Systematic Reviews (LEWIN *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultado da seleção dos estudos

O fluxograma da seleção dos estudos está apresentado na Figura 1. Um total de 118 artigos foi localizado por meio da busca nas bases de dados citadas. Quinze foram excluídos por duplicidade. Após realizar a triagem por título e resumo, 95 foram excluídos por não se adequarem a pergunta PICO, sendo selecionados para leitura integral do texto 8 artigos. Seis deles não cumpriam pelo menos um dos critérios de inclusão, tais como ter sido publicado nos últimos 5 anos, e foram excluídos, restando para análise da qualidade apenas um ECR e uma RS.

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos estudos



3.2 Avaliação da qualidade da evidência

Não foram localizadas evidências diretas comparando o uso do secukinumabe versus o infliximabe no tratamento da AR, portanto, os medicamentos foram avaliados em estudos diferentes. No ECR conduzido por GENOVESE et al., 2014, o secukinumabe na dose de 150 mg apresentou bons resultados para os parâmetros ACR 20, 50 e 70 ao longo de um ano. A condução metodológica do trabalho foi adequada, obtendo uma pontuação 5 quando avaliado pela ferramenta JADAD et al., 1996. A RS conduzida por AALTONEN et al., 2012 mostrou que o infliximabe não obteve resultados significativamente diferentes do controle avaliado. Em termos de segurança, os estudos mostram a descontinuidade no tratamento devido ao aparecimento de efeitos adversos. A frequência dos eventos adversos manteve-se estável com o uso do secukinumabe, no entanto foi observada uma desistência de 8.3% dos pacientes ao tratamento. Quanto ao infliximabe foi observado uma desistência de 11.9% e risco relativo de descontinuidade aumentado de (3.22, IC 95% 1.76– 5.91) em relação ao controle.

4. CONCLUSÃO

Devido a não existência de evidências na literatura comparando diretamente os dois medicamentos analisados nesse trabalho, recomenda-se a elaboração de novos estudos, permitindo assim uma avaliação mais conclusiva na comparação dos fármacos.

5. REFERÊNCIAS

AALTONEN, K. J. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy and Safety of Existing TNF Blocking Agents in Treatment of Rheumatoid Arthritis, *PLoS ONE*, p. 1-14, 2012.

COSTA, J. O. et al. Infliximabe, metotrexato, e sua combinação no tratamento da artrite reumatóide: revisão sistemática e metanálise, *RevBrasReumatol*, p. 146-158, 2015.

FERNANDES, V. et al. Uso de terapias biológicas no tratamento da artrite reumatóide: comparação entre as principais recomendações mundiais e a brasileira, *RevBrasReumatol*, p. 225-230, 2011.

GENOVESE, M. C. et al. One-year efficacy and safety results PF secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: phase II, dose-finding, Double-blind, randomized, placebo-controlled study, *The Journal of Rheumatology*, p. 414-421, 2014.

JADAD, A. R. et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled Clin Trials*, p. 1-12, 1996.

LEWIN, S.; GLENTON, C.; OXMAN, A.D. Use of qualitative methods alongside randomised controlled trials of complex healthcare interventions: methodological study *BMJ*; 339 :b3496, 2009.

MOTA, L. M. H. et al. Artrite reumatóide: tratamento com drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) biológicas, *Medicamentos biológicos na prática médica*, p. 91-112, 2013.

SANFORD, M.; MCKEAGE, K. Secukinumab: First global approval, *Drugs*, p. 329338, 2015.

CAPÍTULO XVII

PROGRAMA DEMONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE ÁREAS CLASSIFICADAS

Renata Lins Carneiro Leão^{1,3}

Anderson Rodrigues de Almeida²

Natalia Cassia do Espirito Santo Nascimento³

Mércia Liane de Oliveira³

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

Michelly Cristiny Pereira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

² Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

³Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN/NE)

E-mail para contato: renata.lleao@hotmail.com

RESUMO – *O monitoramento microbiológico ambiental é fundamental para fornecer informações sobre a qualidade de áreas limpas e ambientes controlados, oferecendo uma maior garantia de qualidade de um*

*produto. Medicamentos injetáveis, como o radiofármaco FDG-F 18, devem ser estéreis e apirogênicos, e por isso, o controle de biocontaminantes neste ambiente produtivo deve fazer parte da rotina das indústrias radiofarmacêuticas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o programa de monitoramento ambiental na Divisão de Produção de Radiofármacos do CRCN/NE, onde é produzido o FDG-F 18, seguindo as recomendações estabelecidas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF). Inicialmente, foi determinado o plano de amostragem, no qual foram definidos os locais de coleta, métodos de monitoramento, volume amostral e a frequência dos testes. Os métodos de monitoramento implantados foram baseados na amostragem passiva do ar (utilizando placas de sedimentação) e amostragem de superfícies (através de placas de contato e coleta com swab). Para validação dos métodos, foram utilizadas suspensões padronizadas de *Candidaalbicans*, *Pseudomonasaeruginosa* e *Staphylococcus aureus* contendo entre 50 e 100 unidades formadoras de colônia (UFC) para determinação da recuperação de microrganismos por cada um dos métodos empregados neste trabalho. Os resultados obtidos nos ensaios de validação demonstraram que os métodos estudados apresentaram uma recuperação adequada (sempre superior a 50%), sendo, portanto, confiáveis para utilização na rotina da garantia da qualidade. Adicionalmente, o programa de monitoramento foi empregado durante a produção e controle de qualidade do FDG-F 18, e demonstrou resultados satisfatórios, indicando que o nível de contaminação do ambiente*

controlado encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA.

Palavras chave: Monitoramento ambiental, Radiofármaco, FDG-F 18.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêuticas buscam continuamente fabricar produtos que atendam às exigências internas da indústria, dos órgãos regulamentadores e do consumidor (PEREIRA, 2009). Todo o processo produtivo é fiscalizado e controlado, a fim de garantir que o produto final esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos. As providências tomadas com o objetivo de assegurar a qualidade do produto constituem a Garantia da Qualidade (BRASIL, 2010) que, de acordo com a RDC 17/2010 da ANVISA, é um conceito amplo, que abrange todos os aspectos que influenciam a qualidade de um produto. Dessa forma, o planejamento e desenvolvimento do produto devem seguir as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e outros requisitos como as Boas Práticas Clínicas (BPC) e as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Processos produtivos realizados em áreas limpas necessitam de cuidados adicionais para manter o ambiente sob condições controladas de contaminação (EUDRALEX, 2008; COUTO, 2011; XAVIER, 2013). Nestes ambientes a contaminação, tanto por partículas

viáveis, como por partículas não viáveis, podem vir a prejudicar a qualidade do produto (SBCC, 2011). Diante disso, é indiscutível a necessidade da implantação de um programa de monitoramento ambiental pelas indústrias farmacêuticas.

O monitoramento ambiental é um conjunto de ações que asseguram a qualidade do ambiente onde são fabricados os medicamentos com os padrões de qualidade exigidos (BRASIL, 2003; PEREIRA, 2009). Tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de contaminação do medicamento produzido na área limpa, indicando a eficácia dos procedimentos de limpeza e sanitização, o desempenho do Sistema de Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado (AVAC), paramentação e limpeza dos operadores e equipamentos (SBCC, 2005; ANVISA 2013). Apesar de suas limitações, o monitoramento ambiental fornece informações sobre o modo de operação do ambiente controlado, portanto, oferece uma maior garantia de qualidade de um produto. (ANVISA, 2013; XAVIER, 2013).

O FDG-F 18 é o radiofármaco mais utilizado para realização de tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês PositronEmissionTomography) e possui relevância e alta especificidade no diagnóstico precoce de tumores malignos, assim como aplicação em cardiologia e neurologia (ARAÚJO et al., 2008). Sua administração é através da via parenteral e, por isso, segue a mesma regulamentação dos medicamentos injetáveis (VILLAS BOAS, 2010). Desta forma, o monitoramento ambiental nas áreas produtivas do FDG-F 18 é fundamental e

fornece uma maior garantia de segurança e pureza do produto (PACHECO; PINTO, 2010). O presente trabalho propôs implantar e validar um programa de monitoramento microbiológico ambiental nas áreas controladas da Divisão de Produção de Radiofármacos (DIPRA) do Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN/NE). Este centro é um órgão vinculado à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), que desenvolve pesquisa na área de energia nuclear e que começou a produzir e distribuir Fluordesoxiglicose (FDG-F 18) (CRCN/NE, 2014).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento do plano de amostragem

O plano de amostragem para o monitoramento microbiológico ambiental foi elaborado com base na análise de risco de contaminação microbiológica dos ambientes classificados e salas limpas, utilizando como referência o Guia de Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica (ANVISA, 2013). Durante a análise de risco foram definidos os pontos críticos e não críticos do ambiente e, posteriormente, foram estabelecidos os locais de coleta, a frequência de amostragem e o número de amostras requeridas. Foi levada em consideração a possível exposição do radiofármaco produzido a microrganismos do ambiente, bem como situações em que há manipulação humana.

2.2 Testes e procedimentos de amostragem

Utilizou-se solução tampão estéril para umedecimento do swab que foi posicionado em ângulo de 30° sobre as superfícies de amostragem e realizou-se a coleta através de movimentos de zig-zag, também em sentido perpendicular. Após a realização da amostragem, o swab foi acondicionado no tubo contendo a solução estéril de origem. Seguidamente, em uma cabine de fluxo laminar, foi realizado o semeio do material em placas de petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA), pela técnica de esgotamento. Por fim, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $33 \pm 2^\circ\text{C}$, por pelo menos cinco dias. Decorrido o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias e registro.

2.2.1 Amostragem com placa de contato (RODAC)

A superfície convexa da placa de contato (RODAC), contendo meio de cultura TSA, foi pressionada no local de amostragem, com força constante e sem movimentos laterais, durante 10 segundos. A placa foi fechada e devidamente identificada. Após a coleta, as placas foram imediatamente incubadas em estufa microbiológica a $33 \pm 2^\circ\text{C}$, por pelo menos cinco dias. Decorrido o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias e registro.

2.2.2 Amostragem com placas de sedimentação

Placas de Petri contendo meio de cultura TSA foram posicionadas, sem tampa, no local de amostragem, durante quatro horas. Após este período, as placas foram

tampadas e incubadas conforme o item 2.2.1. No caso da amostragem das luvas, os operadores aplicaram os cinco dedos com as luvas na placa de contato contendo meio TSA, com força constante e sem movimentos, durante 10 segundos.

2.3 Procedimentos de validação

Todos os ensaios de validação foram realizados em três dias diferentes e utilizando os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Pseudomonasaeruginosa* (Gram -) e *Candidaalbicans* (fungo).

2.3.1 Validação da amostragem passiva do ar

A validação da técnica passiva de amostragem do ar consistiu na sedimentação do ar em placas de petri contendo ágar TSA, exposta ao ambiente por um período de quatro horas. Posteriormente as placas foram levadas para a capela de fluxo laminar para inoculação de alíquotas de suspensões padronizadas contendo entre 50 e 100 UFC, dos três microrganismos mencionados anteriormente. As placas controle não foram expostas ao ambiente. O experimento foi realizado em duplicata. Após três dias de incubação foi realizada a contagem das colônias nas placas e calculada a porcentagem da recuperação por meio da razão entre o número de UFC nas placas de teste e controle. As placas foram pesadas antes e depois da sua exposição, para avaliar se houve perda de água durante o ensaio e a influência deste fator no crescimento microbiano.

2.3.2 Validação da técnica de amostragem de superfícies

A validação dos métodos de amostragem de superfícies (placas de contato e swabs) consistiu na inoculação de suspensões padronizadas (contendo entre 50 e 100 UFC), em diferentes superfícies. Após evaporação completa das alíquotas, foi realizada a amostragem do local, em triplicata, conforme os subitens 4.2.1 e 4.2.2. Adicionalmente, foi inoculada a mesma suspensão microbiana em placas de petri com TSA, as quais foram utilizadas como controle. Após o período de incubação calculou-se a recuperação das UFCs presentes nas placas.

2.4 Análise dos resultados do monitoramento ambiental

Após a validação dos métodos de amostragem, foi realizado o monitoramento ambiental das áreas classificadas, durante três dias de produção do FDG-F 18. Todos os dados obtidos foram registrados e os valores das contagens de microrganismos (em UFC), foram comparados com os limites microbianos aceitáveis fornecidos pela norma RDC 17/2010. Níveis de alerta foram definidos, com o objetivo de tentar controlar o aparecimento de UFC acima dos valores limites e estabelecer parâmetros quantitativos para a tomada de ações corretivas e/ou preventivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do plano de amostragem foi baseada na análise de risco do ambiente de produção do FDG-F 18.

Os dados da validação do método de amostragem passiva do ar (placas de sedimentação), utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonasaeruginosae* *Candidaalbicans*, encontram-se respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3. O método foi validado, visto que, as placas de sedimentação, após exposição, demonstraram uma recuperação média de 80 a 120% dos microrganismos. Além disso, foi observado que, ao decorrer do tempo de exposição, ocorria a evaporação da água do meio (mostrado pela diminuição do peso), porém esse fator não causou interferência no resultado da recuperação. Com isso, foi possível concluir que as placas podem permanecer no local de amostragem durante o período de quatro horas, sem que isso afete o crescimento microbiano.

Os métodos de amostragem de superfícies também foram validados, demonstrando uma recuperação sempre superior a 50%. Os dados obtidos nos ensaios de validação estão mostrados nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 1 - Dados da validação do método de amostragem passiva do ar, utilizando a *Pseudomonasaeruginosa*.

<i>Pseudomonasaeruginosa</i>										
Dia 1										
	Duplicata 1					Duplicata 2				
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	19,0	-	-	-	-	23,0	-
Produção	23,6	21,9	1,6	25,0	131,6	32,1	30,7	1,3	21,0	91,3
Theodorico	28,1	22,8	5,3	21,0	110,5	29,4	23,1	6,4	19,0	82,6
LMB	29,4	27,9	1,6	30,0	157,9	28,6	27,2	1,4	27,0	117,4
Capela	27,2	25,8	1,4	23,0	121,1	26,9	24,7	2,2	34,0	147,8
Dia 2										
	Duplicata 1					Duplicata 2				
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	93,0	-	-	-	-	85,0	-
Produção	30,4	28,7	1,7	97,0	104,3	29,5	28,0	1,5	91,0	107,1
Theodorico	31,2	26,8	4,4	82,0	88,2	30,7	28,2	2,5	89,0	104,7
LMB	29,5	27,9	1,5	103,0	110,8	25,6	24,0	1,6	108,0	127,1
Capela	28,1	24,2	3,9	70,0	75,3	30,0	25,9	4,1	94,0	110,6
Dia 3										
	Duplicata 1					Duplicata 2				
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	81,0	-	-	-	-	84,0	-
Produção	30,7	28,5	2,2	89,0	109,9	31,0	29,3	1,8	93,0	110,7
Theodorico	27,1	23,3	3,8	84,0	103,7	30,3	25,1	5,2	84,0	100,0
LMB	27,9	26,5	1,4	95,0	117,3	34,1	31,9	2,2	89,0	106,0
Capela	30,7	27,7	3,0	83,0	102,5	31,0	28,2	2,8	87,0	103,6

Tabela 2 - Dados da validação do método de amostragem passiva do ar, utilizando a *Candidaalbicans*.

<i>Candida albicans</i>										
Dia 1										
Duplicata 1					Duplicata 2					
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	32	-	-	-	-	31	-
Produção	27,1	26,1	1,0	29	90,6	30,5	28,5	2,0	33	106,5
Theodorico	30,9	24,2	6,6	25	78,1	32,7	25,4	7,3	28	90,3
LMB	28,4	26,5	1,9	36	112,5	26,4	25,0	1,4	39	125,8
Capela	31,1	29,9	1,2	32	100,0	29,6	27,1	2,4	30	96,8
Dia 2										
Duplicata 1					Duplicata 2					
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	69	-	-	-	-	73	-
Produção	28,4	26,9	1,6	83	120,3	26,1	24,6	1,5	75	102,7
Theodorico	27,5	24,2	3,3	67	97,1	27,0	23,1	3,9	71	97,3
LMB	34,2	32,3	1,9	75	108,7	29,4	27,7	1,6	80	109,6
Capela	27,1	22,4	4,7	71	102,9	30,6	25,8	4,8	67	91,8
Dia 3										
Duplicata 1					Duplicata 2					
	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Diferença de peso	Contagem de UFC	Recuperação (%)
Controle	-	-	-	61	-	-	-	-	70	-
Produção	30,3	28,5	1,7	67	109,8	29,6	27,5	2,1	65	92,9
Theodorico	30,3	23,5	6,7	62	101,6	26,9	18,1	8,8	64	91,4
LMB	27,0	24,9	2,1	79	129,5	29,6	27,8	1,8	73	104,3
Capela	27,3	24,5	2,8	66	108,2	31,0	28,2	2,9	62	88,6

Tabela 3 - Resultados da validação dos métodos de amostragem de superfícies (placas de contato e swab), utilizando o *Staphylococcus aureus*.

		<i>Staphylococcus aureus</i>					
		Inox		Acrílico		Macacão	Luva
		Triplicata	Controle	swab	contato	Swab	contato
Dia 1	1	42	28	33	21	29	17
	2	31	36	37	26	23	29
	3	36	31	22	24	32	26
	Média	36	32	31	24	28	24
	Recuperação (%)		87,2	84,4	65,1	77,1	66,1
Dia 2	1	38	43	41	38	37	49
	2	42	40	44	40	41	37
	3	50	47	39	36	36	45
	Média	43	43	41	38	38	44
	Recuperação (%)		100,0	95,4	87,7	87,7	100,8
Dia 3	1	56	37	49	42	44	51
	2	50	48	56	37	43	56
	3	59	53	51	38	49	51
	Média	55	46	52	39	45	53
	Recuperação (%)		83,6	94,5	70,9	82,4	95,8

Tabela 4 - Resultados da validação dos métodos de amostragem de superfícies (placas de contato e swab), utilizando a *Pseudomonas aeruginosa*.

		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
		Inox		Acrílico		Macacão	Luva	
		Triplicata	Controle	swab	contato	Swab	contato	contato
Dia 1	1	32	22	29	30	37	23	
	2	38	27	32	19	28	35	
	3	29	20	25	27	31	33	
	Média	33	23	29	25	32	30	
	Recuperação (%)		69,7	86,9	76,8	97,0	91,9	
Dia 2	1	50	43	41	38	37	49	
	2	53	40	44	40	41	37	
	3	57	47	39	36	36	45	
	Média	53	43	41	38	38	44	
	Recuperação (%)		81,3	77,5	71,3	71,3	81,9	
Dia 3	1	63	27	50	39	59	48	
	2	48	38	48	41	46	55	
	3	56	41	49	57	53	51	
	Média	56	35	49	46	53	51	
	Recuperação (%)		63,5	88,0	82,0	94,6	92,2	

Tabela 5 - Resultados da validação dos métodos de amostragem de superfícies (placas de contato e swab), utilizando a *Candida albicans*.

		<i>Candida albicans</i>					
		Inox		Acrílico		Macacão	Luva
	Triplicata	Controle	swab	contato	Swab	contato	contato
Dia 1	1	40	24	28	27	29	37
	2	34	30	40	33	32	33
	3	46	27	26	29	29	31
	Média	40	27	31	30	30	34
	Recuperação (%)		67,5	78,3	74,2	75,0	84,2
Dia 2	1	46	35	38	33	42	27
	2	42	50	41	38	36	36
	3	36	43	39	31	30	29
	Média	41	43	39	34	36	31
	Recuperação (%)		103,2	95,2	82,3	87,1	74,2
Dia 3	1	51	44	56	38	45	30
	2	53	52	50	36	31	36
	3	58	58	39	47	33	29
	Média	54	51	48	40	36	32
	Recuperação (%)		95,1	89,5	74,7	67,3	58,6

3.3 Resultados do controle microbiológico ambiental

O monitoramento microbiológico ambiental demonstrou que as áreas classificadas do CRCN/NE estão operando dentro das especificações definidas pela ANVISA em termos de contaminação. Os resultados obtidos indicam que os procedimentos de sanitização, o desempenho do sistema AVAC, a paramentação e a limpeza dos operadores e equipamentos estão adequados e oferecem uma maior garantia de qualidade do FDG-F 18.

A partir dos resultados obtidos no monitoramento ambiental, foram definidos os limites de alerta para cada área limpa, os quais se encontram na tabela 7.

Tabela 6 - Limites de alerta para o monitoramento microbiológico ambiental definidos pela DIPRA.

Classificação da área	Placas de sedimentação (UFC/4 horas)	Placas de contato (UFC/placa)	Impressão de dedos de luva (UFC/luva)	Amostragem por Swab (UFC/Swab)
A	1	1	1	1
B	≤3	≤3	≤3	≤3
C	≤30	≤20	-	-
D	≤70	≤40	-	-

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de validação demonstraram que os métodos utilizados no monitoramento são adequados e eficientes para sua finalidade, conseguindo recuperar mais de 50% dos microrganismos testados.

O monitoramento ambiental realizado na rotina de três dias de produção indica que o nível de contaminação do ambiente encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA. Contudo, esse risco de contaminação deve ser monitorado continuamente, conforme a frequência estabelecida pelo plano de amostragem, a fim de detectar qualquer mudança no estado do ambiente. Caso isso ocorra, ultrapassando os limites de alerta, medidas corretivas deverão ser tomadas.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA. Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica. Brasília, 2013.

ARAÚJO, E. B. et al. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44(1), 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA; 2010. Resolução – RDC n°17, de 16 de abril de 2010. Boas

Práticas para a Fabricação e Controle de Produtos Farmacêuticos. Brasília. 2010

COUTO, M. Monitoramento e controle microbiológico. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação – SBCC, Edição 55, p. 10-14, 2011.

EUDRALEX, E.U. Guidelines to Good Manufacturing Practice – Medicinal products for Human and Veterinary Use – Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products, v. 4, 2008.

PACHECO, F. L. C.; PINTO, T. J. The bacterial diversity of pharmaceutical clean rooms analyzed by the fatty acid methyl ester technique. PDA J PharmSci Tech., v. 64(2), p. 156-166, 2010.

PEREIRA, C., Identificação da microbiota presente em áreas classificadas de Produção de uma indústria farmacêutica. Belo Horizonte. Monografia (Curso de Especialização em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

SBCC. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. Seminário: Ensaio em áreas limpas, 2011.

VILLAS BOAS. [18F]FDG: Bula para o Profissional de Saúde. Villas Boas Radiofármacos Brasil S/A, 2010.

XAVIER, M. et al. Importância do monitoramento ambiental em áreas classificadas. Revista de Biologia e Farmácia, v. 9(4), 2013.

CAPÍTULO XVIII

PROCESSOS ENVOLVIDOS PARA O DESCARTE DE REJEITOS E RESÍDUOS GERADOS POR UMA INDÚSTRIA DE VACINAS E SOROS NO BRASIL: UM RELATO DE CASO

Rodrigo Lisboa Nunes Carneiro¹

Anderson Rodrigues de Almeida²

Vanessa Vilches Sant'anna³

Michelly Cristiny Pereira²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

³Instituto Butantan

E-mail para contato:rlisboacar@ig.com.br

RESUMO – *A produção de biomedicamentos pelo Instituto Butantan ocupa uma posição de destaque no Brasil. Esta Instituição é responsável por uma considerável parte da produção nacional de soros hiperimunes e antígenos vacinais que compõem as vacinas utilizadas no Programa Nacional de Imunizações – PNI, do Ministério da Saúde. Por ser um grande produtor de insumos biológicos, é também gerador de uma elevada quantidade de rejeitos e resíduos de diversas naturezas: biológicos, químicos, medicamentos, radiológicos, rejeitos comuns, rejeitos orgânicos, eletroeletrônicos, cartuchos, toners, pilhas, baterias e lâmpadas. Os resíduos produzidos, de uma forma geral, depois de gerados, passam pelos processos de segregação, tratamento para inativação da carga microbiana (dependendo do tipo de resíduo), acondicionamento, identificação, coleta, transporte e incineração. Com o objetivo de levantar os resíduos dentro de uma fábrica de soros e vacinas, os processos de descarte e os custos envolvidos com o transporte e incineração, foram realizadas revisão na literatura e pesquisa de campo no Instituto Butantan, na produção de soros e vacinas, em junho de 2015, em que foram coletadas informações sobre estes resíduos, procedimentos e custos.*

Palavras chave: resíduos, Butantan, biomedicamentos.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação ambiental está presente na legislação brasileira. O art. 23 § VI da Constituição Federal de 1988 dispõe, como sendo uma competência comum da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, a proteção do meio ambiente e combate à poluição em qualquer das suas formas. O art. 225 dá a todos o direito de um meio ambiente ecologicamente equilibrado, de uso comum do povo e essencial à qualidade de vida, sendo de responsabilidade também da população defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações (COSTA; FONSECA, 2009).

No Brasil, a função de gerar regras e orientar qual a melhor maneira de tratar os descartes é realizada pelos órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela RDC n° 306 de 7 de dezembro de 2004, e o Conselho nacional do Meio Ambiente (CONAMA), com a resolução n° 358, de 29 de maio de 2005 (BRASIL, 205-2009).

Entre as práticas que contribuem para a melhoria das condições ambientais e de saúde do trabalhador está a gestão dos resíduos sólidos gerados nas diferentes atividades desenvolvidas no espaço institucional de atuação. Para uma gestão efetiva, comprometida com resultados, a sistematização de informações e procedimentos é fundamental e contribui para uniformizar a implementação das ações mais apropriadas com o mínimo de recursos e tempo (IB, 2014). Neste trabalho, serão apresentados todos os resíduos gerados pelo Instituto Butantan, na área de soros e vacinas, bem

como os procedimentos de descarte e os custos envolvidos na incineração.

2. METODOLOGIA

A revisão bibliográfica foi realizada através da análise da literatura já publicada sobre o tema, em banco de dados e sites relacionados com a legislação vigente.

Para a pesquisa de campo e levantamento dos resultados, foi realizada a visita ao Instituto Butantan em São Paulo, que está vinculado à Secretaria de Saúde do Estado, no período de 8 a 10 de junho.

Baseado em entrevista realizada no Instituto Butantã com a Engenheira Vanessa E. J. VilchesSant'anna, coordenadora de resíduos da Gerência de Meio Ambiente, no Guia de Biossegurança e no Guia Prático de Descarte de Resíduos da Instituição, foram levantados os procedimentos de descarte e levantamento dos custos de incineração de todos os resíduos gerados que serão apresentados neste trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Entrevista no Instituto Butantan

Os dados apresentados abaixo foram coletados através de entrevista que ocorreu com a Eng^a Vanessa E.

J. VilchesSant'anna, coordenadora de Resíduos da Gerência de Meio Ambiente-GMA do Instituto Butantã.

Como se formou a Gerência de Meio Ambiente do Instituto?

RESPOSTA: “O Instituto tem 114 anos e foi há 43 anos atrás, com o ProfDr Jorge Kalil, que as ações voltadas para a gestão ambiental se intensificaram no Butantã. Com a chegada da Gestora Ambiental Neuzeti Maria dos Santos, comigo, que já atuava no IB como Coordenadora de Produção da fábrica de vacinas contra a influenza e com e a Enga Aline Cunha Barbosa, iniciou-se o desenvolvimento da Gerência de Meio Ambiente”.

Qual o foco inicial do trabalho no início das atividades?

RESPOSTA: “Foi desenvolvido um trabalho de 3 anos ininterruptos, com foco sobre os processos de gestão de resíduos sólidos (o maior passivo na época). Assim, as ações de tratamento desses produtos dentro do Instituto se consolidaram. Quando a gerência iniciou os trabalhos, existiam muitos rejeitos químicos e resíduos biológicos (vacinas e soros), que por diversos motivos não foram aprovados para ir para o mercado”.

De onde eram provenientes as grandes quantidades de rejeitos químicos e resíduos biológicos encontrados no início do trabalho da GMA?

RESPOSTA: “Produtos químicos vencidos, lotes reprovados pela área de qualidade, amostras que ficam retidas no controle de qualidade e que posteriormente precisavam ser desprezadas. Neste cenário, e com a

necessidade de eliminar de forma responsável e sustentável os resíduos, a Gerência de Meio Ambiente, implantou ações eliminando os excessos e liberando espaço dentro das áreas”.

Quais as etapas que foram realizadas para implantar o sistema de gerenciamento de resíduos dentro do IB e qual o maior desafio?

RESPOSTA: “Primeiramente, foi criada uma Comissão de Resíduos composta por uma equipe multidisciplinar, que possuía caráter deliberativo nas questões relacionadas a resíduos. Em seguida, foi realizado diagnóstico para identificar os diversos tipos de resíduos produzidos no IB (áreas de pesquisa e produção). Continuando, foram elaborados procedimentos baseados em pesquisas e legislações ambientais vigentes para realizar a correta destinação. Foi realizada também capacitação dos envolvidos na implantação do Programa de Gerenciamento de Resíduos (PGR), comissão e equipe técnica, bem como capacitação dos agentes envolvidos, facilitadores, para atuarem como agentes multiplicadores, nas áreas em que atuam. Somadas estas ações, de certa forma, elas foram as mais desafiantes para o início deste trabalho, por envolverem mudança de cultura e adequação legal”.

Qual foi o resultado final obtido?

RESPOSTA: “O Guia Prático de Descarte, é um dos grandes resultados obtidos nestes 43 anos de atuação. Podemos citar também, o Plano de Gerenciamento de Resíduos do Ibu, que é um documento mais robusto e

completo, onde existe o detalhamento de todas as atividades. Ele é apenas disponibilizado para fiscalizações de Vigilância Sanitária e Órgãos Ambientais”.

Qual foi o grande desafio na implementação das ações de gerenciamento de resíduos?

RESPOSTA: “O grande desafio no IB não foi somente implementar procedimentos de descarte de resíduo, mas também o trabalhar a cultura, comportamento e educação dos colaboradores que trabalham na instituição para que eles seguissem os procedimentos”.

Como funciona a Comissão de Resíduos?

RESPOSTA: “No IB, além da Gerência de Meio Ambiente, existe uma comissão multidisciplinar de gestão de resíduos, que além de engenheiros sanitários e biólogos, é também formada por farmacêuticos, administradores, engenheiro de segurança etc formando uma equipe de gestão compartilhada e participativa, que delibera sobre assuntos relacionados à gestão dos resíduos”.

Como reflexo do eficaz trabalho implementado aqui no IB em relação ao gerenciamento de resíduos, a Instituição já foi procurada para dar apoio à outras empresas no desenvolvimento deste tipo de trabalho?

RESPOSTA: “Sim. Principalmente outras Instituições Públicas tais como FIOCRUZ/Biomanguinhos (Rio de Janeiro), FUNED (Minas Gerais) e CPPI (Paraná). Também, empresas farmacêuticas multinacionais como

Merck e Sanofi, com atividade de produção no Brasil, e outras parceiras do IB”

3.2 Resíduos produzidos no Instituto Butantan (IB)

No IB, os diversos resíduos são originados das atividades desenvolvidas nos laboratórios de pesquisa, produção de vacinas e soros, nos museus e nas unidades de atendimento à saúde humana, como o Hospital Vital Brazil e o Ambulatório.

Além desses, o IB gera outros resíduos, os quais também requerem cuidados e métodos diferenciados de coleta, transporte, recuperação, tratamento e disposição final. São eles:

- Resíduos eletroeletrônicos e seus componentes;
- Pilhas e baterias;
- Lâmpadas.

3.3 Descarte dos resíduos gerados no Butantan

3.3.1 Grupo A: resíduos infectantes

Os resíduos do Grupo A os resíduos infectantes, são resíduos sólidos ou líquidos com a possível presença de agentes biológicos, tais como: bactéria, fungo, vírus, micoplasma príon, parasita, toxina e linhagens celulares. No IB, considera-se resíduo infectante, por exemplo, a mistura de microrganismo e meios de cultura, sobras de amostras contendo sangue ou quaisquer líquidos corpóreos, recipientes e resíduos contaminados

ou não com microrganismo, tais como: luvas, seringas, bolsas de sangue e plasma.

3.3.2 Procedimentos de descarte

Inicialmente, as pessoas que manipulam são orientadas a lavar as mãos (com água e sabão) e utilizar os equipamentos de proteção individual (EPIs) necessários para realização do procedimento, de acordo com a classe de risco.

Os resíduos infectantes são segregados dos demais tipos de resíduos no local da geração e são colocados em um recipiente identificado. São acondicionados, conforme descrito nas tabelas 1 e 2 a seguir. Os sacos brancos são identificados com símbolo de resíduo infectante, e mantidos dentro de lixeiras com pedal (identificadas), e nunca poderão ser esvaziados ou reaproveitados. Depois, são retirados das áreas geradoras, quando atingirem o limite máximo de 2/3 de sua capacidade ou pelo menos 1 vez a cada 24 horas, conforme a RDC 306/2004 da ANVISA.

Os materiais perfurocortantes ou escarificantes contaminados são acondicionados em recipientes rígidos, com tampa, resistentes à perfuração, à ruptura e ao vazamento. O preenchimento do recipiente deverá obedecer à marca tracejada. Feito isso, o recipiente é acondicionado em saco branco, identificado com a simbologia de resíduo infectante e fechado com lacre de nylon.

Os resíduos são transportados por funcionários capacitados em carrinhos fechados, da área geradora até os contêineres basculantes disponíveis nos abrigos específicos nos seguintes lugares: Prédio Novo, Centro de Biotecnologia, Biotério Central e Engenharia da Produção.

3.3.3 Subgrupo A2: carcaças de animais

São consideradas carcaças os animais (vertebrados e invertebrados) mortos, assim como suas peças ou fragmentos anatômicos. Coelho, camundongo, hamster são os principais tipos de cobaias utilizados no IB. Conforme a Resolução CONAMA 358, de 2005, as carcaças dos animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos devem passar por tratamento adequado para inativação, antes do procedimento para descarte.

No caso de organismos geneticamente modificados, seguir a orientação do Guia de Biossegurança do Instituto Butantan, lembrando que todo animal geneticamente modificado ou contaminado com OGM deverá ser submetido à desinfecção ou inativação antes de ser descartado.

Os procedimentos são diferenciados conforme o porte do animal, pois o tamanho da carcaça deve ser compatível com o processo de tratamento a ser utilizado. Dessa forma, os animais de médio e grande porte, como os cavalos da Fazenda do Instituto Butantan, são sepultados em área apropriada, e, como não é objetivo específico deste trabalho, não será mencionado.

Tabela 1 - Procedimentos para descarte de resíduo infectante com suspeita ou presença de microrganismos.

Fonte: Guia Prático de Descarte de Resíduos. Instituto Butantan, 2014. Pág 13.

Resíduo	Tratamento na unidade geradora	Acondicionamento/ Destinação
Com suspeita ou presença de microrganismos	Nível de biossegurança	
Sólido	Meios de cultura (sólido e semissólido); - Materiais contendo sangue ou outros fluidos corpóreos - Recipientes - Materiais de Laboratório	Saco branco Resíduo infectante
	Materiais Perfurocortantes (Caixa Perfurocortante - Resíduo Infectante)	Saco branco Resíduo infectante
	EPIs	Saco branco Resíduo infectante
Líquido	Meios de cultura e soluções*	Rede de esgoto*
		Tratamento de efluentes
	Contendo sangue ou outros fluidos corpóreos (Humano ou Animal)*	Rede de esgoto*
		Tratamento de efluentes
Organismo Geneticamente Modificado - OGM	Resíduos SÓLIDOS originários de laboratório de manipulação Genética	Saco branco Resíduo infectante
	Resíduos LÍQUIDOS originários de laboratório de manipulação Genética*	Rede de esgoto*
		Tratamento de efluentes
Outros	Filtros de ar de áreas contaminadas	Engenharia
	Membranas Filtrantes	Saco branco Resíduo infectante

* Quando houver presença dos antibióticos Anfotericina B, Penicilina, Gentamicina, Ampicilina ou Neomicina, o tratamento deverá ser obrigatoriamente físico. Na presença de antibiótico Cloranfenicol ou Canamicina (termoestáveis), o resíduo deverá ser destinado sempre como resíduo químico.

Apenas soluções com pH na faixa de 6,5 a 7,5. Fora desta faixa, o pH da solução deverá ser ajustado antes do descarte.

Tabela 2 - Procedimentos para descarte de resíduo infectante com ausência de microrganismos.

Fonte: Guia Prático de Descarte de Resíduos. Instituto Butantan, 2014. Pág 14.

Resíduo	Tratamento na unidade geradora	Acondicionamento/ Destinação	
Ausência de microrganismos	Nível de biossegurança		
Sólido	Meios de cultura (sólido e semissólido); – Materiais de Laboratório – Recipientes – EPIs	Saco branco Resíduo infectante	
	Materiais Perfurocortantes (Caixa Perfurocortante - Resíduo Infectante)	Saco branco Resíduo infectante	
Líquido	Meios de cultura e soluções, sem antibiótico ou qualquer produto químico perigoso	Rede de esgoto*	
	Meios de cultura e soluções contendo antibiótico*	Tratamento Físico	Rede de esgoto*
	Culturas de células de linhagem ou cultura primária de origem ANIMAL ¹	Tratamento Químico ou Físico (opcional)	Rede de esgoto*
	Contendo sangue e outros fluidos corpóreos de origem ANIMAL ¹	Tratamento Químico ou Físico (opcional)	Rede de esgoto*
	Contendo sangue ou outros fluidos corpóreos de origem HUMANA	Tratamento Químico ou Físico	Rede de esgoto*
	Culturas primária de células de origem HUMANA	Tratamento Químico ou Físico	Rede de esgoto*
Organismo Geneticamente Modificado - OGM	Resíduos SÓLIDOS originários de laboratório de manipulação genética	Saco branco Resíduo infectante	
	Resíduos LÍQUIDOS originários de laboratório de manipulação genética ¹	NBS 1 e 2: Tratamento Químico ou Físico NBS 3 e 4: Tratamento Físico	Rede de esgoto* Tratamento de efluentes
	Frascos de soros e vacinas	Saco branco Resíduo infectante	
Outros	Bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes	Saco branco Resíduo infectante	
	Resíduos de fabricação de produtos biológicos	Saco branco Resíduo infectante	

* Quando houver presença dos antibióticos Anfotericina B, Penicilina, Gentamicina, Ampicilina ou Neomicina, o tratamento deverá ser obrigatoriamente físico. Na presença de antibiótico Cloranfenicol ou Canamicina (termoestáveis), o resíduo deverá ser destinado sempre como resíduo químico.

Apenas soluções com pH na faixa de 6,5 a 7,5. Fora desta faixa, o pH da solução deve se ajustado antes do descarte.

¹ Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6Log₁₀, e inativação de esporos do *B. Stearother-mophilus* ou de esporos do *B. subtilis* com redução igual ou maior que 4Log₁₀.

Observação

O tratamento físico (autoclavação) na unidade geradora deve ser realizado em equipamento compatível com o Nível III de inativação microbiana¹. No tratamento químico com finalidade antimicrobiana, deve ser observada a Portaria ANVISA RDC nº 31/2011. O tratamento químico é uma alternativa que só deve ser utilizada na impossibilidade do tratamento físico.

3.3.4 Grupo B: resíduos químicos

No plano de segregação, armazenamento e rotulagem do Programa de Gerenciamento de Resíduos do Instituto Butantan, os resíduos químicos foram classificados conforme ABNT-NBR-10004:2004:

- a. resíduos classe I: Perigosos;
- b. resíduos classe II: Não Perigosos (Ibu,2014).

De acordo com a Resolução ANTT 420, os resíduos perigosos são subdivididos em 9 classes, de acordo com o risco ou o mais sério dos riscos que apresentam. São eles:

Classe 1 – Explosivos

Subclasse 1.1: Substâncias e artigos com risco de explosão em massa;

Subclasse 1.2: Substâncias e artigos com risco de projeção, mas sem risco de explosão em massa;

Subclasse 1.3: Substâncias e artigos com risco de fogo e com pequeno risco de explosão ou de projeção, ou ambos, mas sem risco de explosão em massa;

Subclasse 1.4: Substâncias e artigos que não apresentam risco significativo;

Subclasse 1.5: Substâncias muito insensíveis, com risco de explosão em massa;

Subclasse 1.6: Artigos extremamente insensíveis, sem risco de explosão em massa.

Classe 2 – Gases:

Subclasse 2.1: Gases inflamáveis;

Subclasse 2.2: Gases não inflamáveis, não tóxicos;

Subclasse 2.3: Gases tóxicos.

Classe 3 – Líquidos inflamáveis

Classe 4 – Sólidos inflamáveis; substâncias sujeitas à combustão espontânea; substâncias que, em contato com a água, emitem gases inflamáveis:

Subclasse 4.1: Sólidos inflamáveis, substâncias autorreagentes e explosivos sólidos insensibilizados;

Subclasse 4.2: Substâncias sujeitas à combustão espontânea;

Subclasse 4.3: Substâncias que, em contato com a água, emitem gases inflamáveis; 52

Classe 5 – Substâncias oxidantes e peróxidos orgânicos

Subclasse 5.1: Substâncias oxidantes;

Subclasse 5.2: Peróxidos orgânicos;

Classe 6 – Substâncias tóxicas e substâncias infectantes

Subclasse 6.1: Substâncias tóxicas;

Subclasse 6.2: Substâncias infectantes(ver capítulo 4.1);

Classe 7 – Material radioativo

Classe 8 – Substâncias corrosivas

Classe 9 – Substâncias e artigos perigosos diversos (Ibu,2014)

3.3.5 Procedimento de descarte

Os resíduos químicos são segregados nas unidades geradoras no momento da geração. Uma importante prática é atentar ao rótulo e a Ficha de Informação de Segurança do Produto Químico (FISPQ) dos reagentes, para levantamento das periculosidades e características físico-químicas. Logo após, os químicos perigosos são separados dos não perigosos. Os resíduos químicos incompatíveis NUNCA podem ser misturados e, além disso, deve-se atentar à compatibilidade dos

resíduos com os frascos de armazenamento. Como exemplo, alguns reagentes químicos são incompatíveis com PEAD (Polietileno de Alta Densidade), material das bombonas fornecidas pelo Estoque do Instituto Butantan. Por isso, quando se fala em descarte de produtos químicos, a consulta de uma bibliografia de referência se faz necessária para completo entendimento das incompatibilidades.

Em seguida, são acondicionados em coletores fornecidos pelo Setor de Estoque/Almoxarifado do Instituto Butantan, conforme abaixo:

-Bombonas para líquidos;

-As caixas de papelão homologadas para acondicionamento de sólidos;

-Sacos plásticos de cor laranja para embalagens de plástico vazias, luvas, papéis contaminados etc; 53

-Caixas de cor laranja para perfurocortantes, até atingirem o limite de 2/3 de sua capacidade.

É proibida a utilização de outras embalagens que não sejam as fornecidas pelo Instituto Butantan, exceto para as substâncias incompatíveis com as mesmas.

3.3.6 Resíduos de medicamentos

Os resíduos de medicamentos são segregados dos demais resíduos nas unidades geradoras. Existem 2 classes de resíduos medicamentosos: os provenientes de medicamentos comuns e os de medicamentos sujeitos a controle especial (Portaria ANVISA nº 344, de 12 de maio de 1998, e RDC nº 39, de 9 de julho de 2012).

Os resíduos medicamentosos, controlados ou não, são acondicionados em caixas homologadas para transporte de resíduos químicos, até atingirem o limite de 2/3 de sua capacidade. As caixas homologadas contendo os resíduos permanecem abertas para conferência, e serão fechadas pelo químico responsável do DGA no momento da coleta interna. As embalagens vazias são acondicionadas em recipiente para resíduos perfurocortantes químicos de cor laranja, que por sua vez são acondicionadas em sacos plásticos de cor laranja. Estas embalagens são solicitadas ao Setor de Estoque do Instituto Butantan.

3.3.7 Resíduos radioativos

Os rejeitos radioativos devem ser separados, fisicamente, de outros materiais, evitando contaminá-los desnecessariamente e visando diminuir o volume do rejeito radioativo gerado. Os rejeitos radioativos devem ser separados conforme:

- 1 Natureza da radiação: alfa, beta ou gama;
- 2 Meia-vida: curta - $T_{1/2} < 60$ dias ou longa – $T_{1/2} > 60$ dias;
- 3 Estado físico: sólido ou líquido (IB,2014).

Os rejeitos radioativos que requerem decaimento radioativo são mantidos separados dos outros materiais radioativos em uso, em local com blindagem de acordo com sua classificação e, depois do decaimento, são descartados como resíduo de saúde, segundo a sua natureza (infectante ou químico).

3.3.8 Demais resíduos gerados pelo IB

Pelas observações realizadas e de acordo com o Guia Prático de Descarte, outros resíduos importantes também gerados e que devem ser considerados neste trabalho são:

-Rejeitos comuns: os que não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, que compreendem os resíduos gerados na copa, refeitório e na creche (rejeitos orgânicos, por exemplo);

-Resíduos recicláveis: compreendem àqueles que após sofrerem uma transformação química e/ou física podem ser recuperados seja na sua forma original ou como matéria-prima, retornando ao ciclo produtivo;

-Resíduos eletroeletrônicos: neste caso compreendem os diversos equipamentos eletrônicos utilizados no Ibu, bem como partes ou peças necessárias para o seu funcionamento;

-Cartuchos e toners: utilizados nas várias impressoras da instituição;

-Pilhas e baterias: utilizadas nos diversos equipamentos eletrônicos em uso nos laboratórios, hospitais e centros de pesquisa;

-Lâmpadas.

Para todos estes resíduos, as etapas envolvidas na eliminação são bem semelhantes e compreendem: segregação, acondicionamento, identificação, transporte e tratamento final.

3.3.9 Empresas conveniadas para recolhimento dos resíduos no IB

Conforme a lei 13.478/02, de 30 de dezembro de 2002 do município de São Paulo, todas as empresas que gerem acima de 200L de lixo por dia é considerado um grande gerador de lixo. Portanto, frente a esta determinação e por ser um grande gerador de resíduos e rejeitos, a instituição tem contrato com as seguintes empresas abaixo:

-Multilixo Remoções de Lixo S/S LTDA: resíduo comum;

-Loga Logística Ambiental de São Paulo SA: Resíduos infectantes, carcaças e químicos;

-Cooperativa de Catadores de São Paulo: Resíduos recicláveis e eletroeletrônicos:

-Cartuchos e toners: logística reversa realizada pelas próprias empresas produtoras deste produto.

3.3.10 Quantidades e Custos Envolvidos para a Destruição de Resíduos

De acordo com o levantamento realizado pela Gerência de Meio Ambiente do IB, abaixo segue a quantidade dos principais tipos de resíduos gerados no ano de 2014, bem como os custos envolvidos:

Tabela 3 - Quantidade de resíduos gerados pelo IB no ano com os respectivos valores financeiros dos descartes em 2014

TIPO DE RESÍDUO	QUANTIDADE EM TONELADAS/ANO	% EM QUANTIDADE	VALOR EM R\$ INVESTIDO/ANO	% EM VALOR	PREÇO R\$ POR KG
Comuns	345	57	320.000,00	38	0,93
Infectantes	326	37	450.000,00	54	1,99
Químicos	22	4	37.000,00	5	1,68
Carcaça	13	2	21.000,00	3	1,61
TOTAL	606	100	828.000,00	100	---

Fonte: Autor

4. CONCLUSÃO

Sem dúvidas, os processos de um descarte responsável são imprescindíveis à sustentabilidade do planeta, a conservação do meio ambiente e a manutenção da saúde pública.

Baseado nas informações apresentadas é possível entender as normas, processos envolvidos e importância para o meio ambiente das corretas formas de descarte dos rejeitos e resíduos produzidos por uma indústria de soros e vacinas.

O grande volume de OGM's manipulados e cultivados nestes locais faz com que seja necessário o tratamento prévio de todos os resíduos que entraram em contato com estes microrganismos, com a finalidade de inativá-los antes de serem descartados, e assim, impedir a proliferação deles no meio ambiente.

O levantamento de todos os resíduos gerados, o estabelecimento de fluxos bem definidos e a conscientização de todos os funcionários em relação a estas práticas são fundamentais para o sucesso, a manutenção e a operação de todos os processos envolvidos.

Para o recolhimento dos resíduos, os documentos “manifesto de resíduo” e o “certificado de destruição”, constituem documentos fundamentais que certificam que uma empresa promove o destino dos seus rejeitos de forma responsável e correta.

É importante ressaltar que, desenvolvimento de uma indústria de vacinas, frente aos valores financeiros apresentados e à grande quantidade de resíduos produzidos, o custo com os processos de destruição precisa ser considerados, orçados e provisionados.

O fato de empresas multinacionais utilizarem como base os procedimentos de descarte do IB fortalece de como as ações desenvolvidas neste instituto são importantes, consistentes e reconhecidas.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC n° 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); 2005-2009. Apresenta definições em biossegurança.

COSTA, Wesley Moreira da; FONSECA, Maria Christina Grimaldi da. HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde; dez/2009; p 12. Apresenta a importância do gerenciamento dos resíduos hospitalares e seus aspectos positivos para o meio ambiente.

IBU. Instituto Butantan. 2014. Comissão de Resíduos e Departamento de Gestão Ambiental. Guia Prático de Descarte de Resíduo. 1° edição. São Paulo. 2014

CAPÍTULO XIX

EFICÁCIA E SEGURANÇA DO OMALIZUMABE NO TRATAMENTO DA ASMA GRAVE

Roeckson Carlos Peixoto Silva¹

Priscilla Stela Santana de Oliveira²

Valdênia Maria Oliveira de Souza³

Maira Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, UFPE

E-mail de contato: roeckson@gmail.com

RESUMO –*Pacientes portadores de asma grave estão susceptíveis a constantes crises devido a falha do tratamento convencional. Neste contexto, fármacos imunomoduladores, como o omalizumabe, constituem alternativas terapêuticas no tratamento da asma grave. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia e segurança do omalizumabe no tratamento da asma grave. Com este intuito, foi realizada uma busca nas bases de dados Scopus, Biblioteca Virtual em Saúde e Scielo de ensaios*

clínicos publicados no período de 2010 a 2015. Foram localizados 116 trabalhos e após triagem apenas oito estudos foram selecionados para leitura do texto integral. A análise dos estudos evidenciou que o omalizumabe é um medicamento eficaz e seguro, podendo ser utilizado como auxiliar no tratamento da asma grave.

Palavras chave: Omalizumabe, anti-IgE, asma grave, tratamento da asma

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores caracterizada por episódios de dispneia, opressão torácica, sibilância e tosse. Estes sintomas podem variar em frequência e intensidade ao longo do tempo. A abordagem terapêutica usual compila estratégias de eliminação dos agentes desencadeantes, uso de anti-inflamatórios e broncodilatadores. A asma grave consiste na apresentação clínica da asma de maior gravidade devido a persistência das crises e a mínima resposta a terapia convencional (FERNANDES et al., 1996; GINA 2014).

Atualmente, a asma é tida como um problema de saúde global, por afetar indivíduos de todos os níveis sociais e grupos etários, constituindo uma sobrecarga substancial para os doentes e a sua família, bem como um ônus para sistema de saúde e a sociedade. Estima-se que a asma afete 300 milhões de pessoas a nível mundial

(GINA, 2014). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos, considerando-se uma prevalência global de 10% (SOLE et al., 2006).

Nos indivíduos sensibilizados, a reexposição ao alérgeno produz ligações cruzadas entre os receptores da imunoglobulina E de alta afinidade (FcεRI) presentes em mastócitos e basófilos. Este processo desencadeia a degranulação destas células efectoras e liberação de mediadores inflamatórios imediatos e tardios, responsáveis pela fisiopatologia da asma alérgica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O omalizumabe (Xolair®) é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga seletivamente a imunoglobulina E (IgE). Dessa forma, reduz a quantidade de IgE livre, evitando sua ligação ao receptor FcεRI e o desencadeamento da cascata alérgica da asma. O tratamento também reduz o número de receptores FcεRI em basófilos (NOVARTIS, 2015).

O tratamento medicamentoso da asma grave tem como objetivo controlar os sintomas e reduzir o número de internações. No entanto, mesmo em uso contínuo das medicações convencionais (corticosteróides inalatórios associados a broncodilatadores de longa ação), alguns pacientes com a asma grave não conseguem controlar os sintomas, necessitando de uma abordagem terapêutica diferenciada. Nesse contexto, o omalizumabe, surge como representante de uma nova classe de fármacos

moduladores que se tem mostrado efetiva (FERNANDES et al., 1996; GINA 2014).

Em virtude de a asma grave constituir uma morbidade de relevante impacto social e baixo potencial de resposta a abordagem terapêutica usual, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia e segurança do omalizumabe no tratamento da asma grave.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estratégia de busca de informação

O levantamento de dados buscou estudos publicados no período de 01/01/2000 a 05/08/2015. As consultas foram realizadas nas bases de dados Scopus, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Scielo. A triagem dos estudos obedeceu a critérios de inclusão e exclusão por meio da leitura do título e resumo. As estratégias de busca utilizadas em cada base estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1 - Estratégias de busca

Base de dados	Estratégias	Número de estudos
Scopus	TITLE-ABS-KEY ("omalizumabe" OR "anti-IgE" AND "asthma treatment") AND DOCTYPE(ar OR re) AND SUBJAREA(MULT OR MEDI OR NURS OR VETE OR DENT OR HEAL) AND PUBYEAR > 1999 AND (LIMIT-TO(LANGUAGE,"English") OR LIMIT-TO(LANGUAGE,"Portuguese"))	42
BVS	tw:(tw:(omalizumab anti-ige asthma treatment) AND (instance:"regional") AND (clinical_aspect:"therapy") AND limit:("humans") AND la:("en" OR "es") AND (instance:"regional") AND (fulltext:("1"))	72
SciELO	“omalizumab” OR “anti-IgE” AND “asthma treatment”	2
Total		116

Fonte: BVS (Biblioteca Virtual em Saúde)

2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas nesta análise apenas estudos clínicos. As buscas consideraram estudos realizados em humanos, que avaliaram os pacientes com asma e tratados com o omalizumabe, e publicados nos idiomas português, inglês ou espanhol.

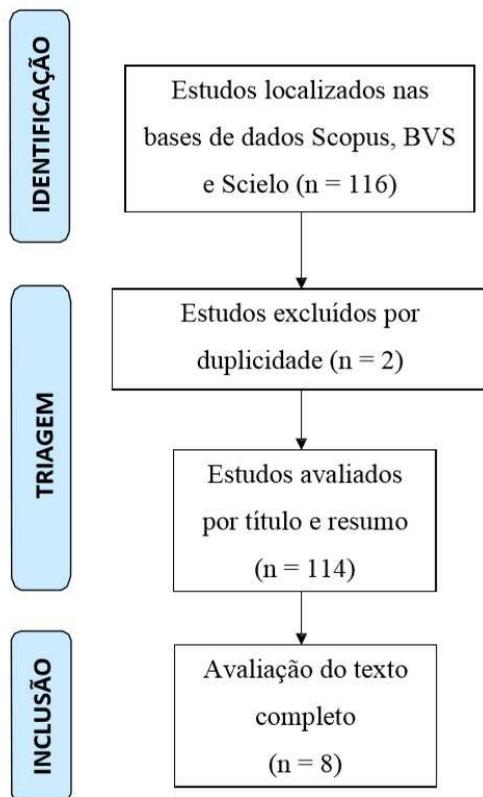
2.2 Critérios de exclusão

Estudos não disponibilizados integralmente, revisões, bem como os estudos não publicados nos idiomas português, inglês ou espanhol e que avaliaram outros desfechos secundários não relacionados a asma grave foram excluídos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de seleção dos estudos para avaliação da indicação do Omalizumabe no tratamento da asma grave está esquematizado no diagrama de fluxo da figura 1. Um total de 116 estudos foram localizados nas bases de dados referidas utilizando as estratégias de busca detalhadas na tabela 1. Após a triagem pela leitura do título e do resumo, dois estudos foram excluídos por apresentarem duplicidade nas bases e 106 por não atenderem os critérios de inclusão. Foram selecionados para leitura de texto integral 8 estudos.

Figura 1 - Diagrama de fluxo da seleção dos trabalhos



A efetividade e segurança do uso do omalizumabe no tratamento da asma grave étêm sido demonstradas nos diferentes ensaios clínicos avaliados. O medicamento foi capaz de promover a redução de mediadores da cascata inflamatória da asmatais quais os níveis séricos de IgE

livre por 4 a 6 semanas (MOLIMARDA et al.,2008), a concentração sérica da proteína catiônica de eosinófilos, contagem de eosinófilos no sangue periférico (ZIETKOWSKI et al.,2011) bem como a liberação de histamina e as citocinas GM-CSF, IL-2 e IL-13 (NOGA et al.,2006;2007).

Foram observadas a redução da frequência das crises e diminuição do requerimento de corticoides orais em pacientes com asma grave submetidos a acompanhamento na Espanha e Portugal(ANCOCHEA et al.,2014; ALFARROBA et al.,2014). Efeito semelhante também foi observado em crianças (6 < 12 anos de idade), com perfil de aceitabilidade seguro (LANIER et al., 2009).

Em estudo preditivo realizado nos Estados Unidos foi demonstrado que o tratamento de todos os pacientes elegíveis implicaria em uma redução de 30% das exacerbações, de 37% das entradas em unidade de pronto socorro e de 38% das hospitalizações. Sua inclusão no esquema terapêutico permitiria o controle da asma moderada e grave, onde 45% dos pacientes passariam a fazer uso mínimo da dose de corticosteróides (GROSSMAN et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

Os estudos clínicos selecionados corroboram com a indicação do omalizumabe para tratamento auxiliar da

asma grave, cujos sintomas são inadequadamente controlados com a terapia convencional.

5. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Hipersensibilidade imediata. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Tradução de Claudia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.441-461.

ALFARROBAA, S., VIDEIRAA, W., GALVÃO-LUCASA, C., CARVALHOB F., BÁRBARAA, C. Experiência clínica com omalizumab na consulta de asma grave. *Rev Port Pneumol*, v.20(2), p.78-83, 2014.

ANCOCHEAA, J., CHIVATOB, T., CASANC, P., PICADOD, C., HERRÁEZE, L., CASAFONTEA, J. Profile of patients treated with omalizumab in routine clinicalpractice in Spain. *AllergolImmunopathol (Madr)*, v.42(2), p.102-108, 2014.

FERNANDES, A. L. G., CABRAL, A. L. B., FARESin, S. M. I. Consenso Brasileiro de Educação em Asma - *J Pneumol*, v.22,1996.

GINA (Global Initiative for Asthma). Um guia de bolso para médicos e enfermeiros 2014. Disponível em: < http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Pocket_Portuguese2014.pdf > Acesso em: 08 de ago. 2015.

GROSSMAN, H. L., SCHLENDER, A., ALPERIN P., STANLEY, E. L., ZHANG, J. Modeling the effects of omalizumab over 5 years among patients with moderate-to-severe persistent allergic asthma. *Current Medical Research & Opinion*, v.26(12),2010.

MOLIMARDA, M., BLAYB, F., DIDIERC, A., GROS, V. L. Effectiveness of omalizumab (Xolairs) in the first patients treated in real-life practice in France. *Respiratory Medicine*, v.102, p. 71–76, 2008.

NOGA, O., HANF, G., KUNKEL, G., KLEINE-TEBBE, J. Basophil Histamine Release Decreases during Omalizumab Therapy in Allergic Asthmatics. *Int Arch AllergyImmunol*, v.146, p.66–70, 2008.

NOGA, O., HANF, G., BRACHMANN, I., KLUCKEN, A. C., KLEINE-TEBBE, J., ROSSEAU, S., KUNKEL, G., SUTTORP, N., SEYBOLD, J. Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *J AllergyClinImmunol*, 2006.

PORTAL NOVARTIS. Asma grave. Disponível em: < <https://portal.novartis.com.br/tiposde-asma#conteudoAbaMobile> > Acesso em: 08 de ago. de 2015.

SOLÉ, D., WANDALSEN, G. F., CAMELO-NUNES, I.C., NASPITZ, C.K. Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in

Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr*, v.82(5), p.341-6, 2006.

ZIETKOWSKI, Z., SKIEPKO, R., TOMASIAK-LOZOWSKA, M. M., BODZENTALUKASZYK, A. Airway inflammation and eotaxin in exhaled breath condensate of patients with severe persistent allergic asthma during omalizumab therapy. *Advances in Medical Sciences*, v.56, p.318-322, 2011.

CAPÍTULO XX

A MICROBIOLOGIA COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Sarah Maria Nigro Sarmento¹

Lilia Vieira Galdino²

Bruno Severo Gomes²

Marina Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)

E-mail para contato:sarah.nigro@hotmail.com

RESUMO – *A contaminação de produtos farmacêuticos por micro-organismos patogênicos representa elevado perigo aos pacientes podendo agravar o quadro. A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos pode ser proveniente do ambiente, do ar comprimido, do material de embalagem, dos equipamentos e utensílios utilizados na produção, das matérias-primas, da água utilizada no processo, da*

higienização incorreta ou ainda através da contaminação direta da equipe operacional. A implementação e acompanhamento das boas práticas de fabricação é uma das ferramentas da garantia qualidade. Desta forma, é fundamental o controle e monitoramento destes pontos vulneráveis para evitar a inserção e proliferação de micro-organismos infectantes.

Palavras chave: Contaminação microbiológica; Fontes de contaminação; Boas práticas de fabricação.

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos patogênicos representam um elevado perigo de contaminação aos produtos farmacêuticos. A alteração ocasionada pelo micro-organismos tem ocorrido em pacientes podendo agravar o quadro clínico de pacientes já debilitados pela doença e dificultar sua adesão ao tratamento (YAMAMOTO et al., 2004; BONFILIO et al., 2013). A principal forma de evitar a inserção e proliferação de micro-organismos infectantes é a prevenção.

A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos pode ser proveniente de várias origens devido à complexidade dos processos de produção. A qualidade pode ser alcançada de diversas formas: Controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, sanitização dos equipamentos e controle ambiental.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi efetuada a revisão da literatura nacional e internacional utilizando bancos de dados como o Scielo (Scientific Electronic Library Online), Lilacs (Literatura LatinoAmericana e do Caribe em Ciências da Saúde), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde). A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais, artigos de revisão, livros e diretrizes nacionais e internacionais.

Para inclusão nesta revisão foram selecionados materiais que apresentaram informações sobre o controle microbiológico dos medicamentos e correlatos, seu controle de fabricação e legislação vigente para este tipo de produto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Micro-organismos contaminantes de produtos farmacêuticos

A transmissão de micro-organismos patogênicos para produtos farmacêuticos representa elevado perigo ao consumidor podendo complicar o quadro clínico de pacientes já debilitados pela doença e dificultar sua adesão ao tratamento. A ocorrência de casos de contaminação por micro-organismos através de produtos farmacêuticos já foi relatada por *Salmonella*(1966); *Pseudomonas*(1966, 1987); *Pseudomonasaeruginosa* (*P. aeruginosa*)(1966); *Mycobacterium chelonae* (1987).

(YAMAMOTO et al., 2004; BUGNO et al, 2005; BONFILIO et al., 2013)

Os micro-organismos são considerados pela microbiologia como seres que apresentam condições que garantam sua replicação e encontrados em diversos habitats. Fatores como: Temperatura, umidade e pH são favorecedores da sua capacidade de permanência e multiplicação. A temperatura influencia diretamente a multiplicação no ambiente. A umidade favorece o crescimento sendo assim, a exigência de indústrias de pós, grânulos e comprimidos é de um ambiente com baixa umidade relativa (PINTO, 2003). O pH está relacionado com a respiração dos micro-organismos, é observado que bactérias patogênicas são mais exigentes quanto aos valores de pH.

3.2 Avaliação dos riscos e pontos críticos de contaminação microbiológica no processo de fabricação de produtos farmacêuticos

O produto farmacêutico, cosmético e fitoterápico pode ser contaminado por várias fontes devido à complexidade dos processos de produção. Deve ser feito o controle microbiológico, controle dos insumos, dos pontos de processo, do produto semiacabado e do produto final com referência em padrões de qualidade estabelecidos na fase de desenvolvimento do produto e na validação dos seus processos (BRASIL, 2003; YAMAMOTO et al., 2004; BRASIL, 2010).

O controle microbiológico é fundamental para garantia das propriedades terapêuticas. Assim, a poluição

na água de irrigação, atmosfera, solo, condições da coleta, manipulação, secagem e estocagem são fatores importantes a serem considerados, pois favorecem a contaminação micro-organismos, por vezes patogênicas (BUGNO et al., 2005).

A água é uma das matérias-primas de maior consumo nos laboratórios farmacêuticos e um dos principais fatores de desencadeamento de alterações nas formulações. Na indústria farmacêutica os três principais tipos de água utilizada são: água potável, água purificada (AP) e água para injetáveis (API). A qualidade da água deve ser monitorada de acordo com as especificações prescritas pelas farmacopéias. O controle ambiental é um conjunto de medidas que se estendem desde o controle do ar que circula nas áreas limpas, utensílios e materiais que interagem na fabricação do medicamento até os operadores que participam de todo o processo. Para isso, faz-se necessário uma adequada instalação fabril e procedimentos para evitar a contaminação cruzada (BRASIL, 2013).

3.3 Prevenção da contaminação microbiológica e manutenção da qualidade de produtos farmacêuticos

A produção de medicamentos seguros e eficazes para a saúde, é uma das responsabilidades da indústria farmacêutica para contribuir na melhoria da qualidade de vida da população. A qualidade microbiológica de produtos é uma das características para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitação no mercado. O controle de

qualidade é integrar atividades que objetivam verificar e assegurar a conformidade dos produtos de acordo com os padrões exigidos, utilizando para isso instrumentos de análise, medição e prevenção.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) tem o papel de controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, incluindo os medicamentos. A legislação brasileira regulamenta as Boas Práticas de Fabricação e estabelece padrões de qualidade para os fármacos. (CRF-PR, 2012).

Na literatura vários trabalhos relatam que para assegurar a imagem e permanência de empresas neste mercado, é necessário a implementação de boas práticas como garantia da qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos (YAMAMOTO, et al., 2004; ANDRADE et al., 2005; CALARGE et al., 2007; SILVA et al., 2008; ALVES et al., 2009).

4. CONCLUSÃO

É necessário controlar e monitorar os pontos vulneráveis do processo produtivo, regulamentados pelas boas práticas de fabricação para que os produtos sejam fabricados em conformidade com as normas requeridas para a sua comercialização. Desta forma, é possível observar que a prevenção e manutenção da qualidade nas indústrias farmacêuticas dependem do controle microbiológico.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, A. P., MOURA, A., VAN NEUTGEM, E. R., SILVA, J. M., CUNHA, N. S., OKA, S. K., MACHADO, S. R. P. Avaliação das boas práticas de manipulação nas farmácias com manipulação de Cuiabá e Várzea Grande, Estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmácia*. Rio de Janeiro, v.90(1), p. 75-80. 2009.

ANDRADE, F. R. O., ARANTES, M. C. B., SOUZA, A. A., PAULA, J. R., BARA, M. T. F. Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 2(2), p. 9-12. 2005.

BONFILIO, R., SANTOS, O. M. M., NOVAES, Z. R., MARTINATTI, A. N. F., ARAUJO, M. B. Controle de qualidade físico-químico e microbiológico em 2347 amostras manipuladas 30 em 2010 e 2011. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada*, v. 34(4), p. 527-535. 2013.

BRASIL; RDC n. 210, de 4 de agosto de 2003. Regulamento técnico das boas Práticas para a fabricação de medicamentos. ANVISA. *Diário Oficial da União*, Brasil, Brasília, 14 de Agosto de 2003.

BRASIL; 2010. RDC n. 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. ANVISA. *Diário Oficial da União*, Brasil, Brasília, 12 de Abril de 2010.

BRASIL; 2013. Guia da qualidade para sistemas de tratamento de ar e monitoramento ambiental na indústria farmacêutica. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. ANVISA. Brasília 2013.

BUGNO, A., BUZZO, A. A., NAKAMURA, C.T., PEREIRA, T.C., MATOS, D., PINTO, T. J. A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v. 41(4), p. 491-497, 2005.

CALARGE, F. A., SATOLO, E. G., SATOLO, L. F. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (boas práticas de fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. *Gestão e Produção*. São Carlos, v. 14(2), p. 379-392, 2007.

PINTO, T. J. A. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

SILVA, A. S., SEVERO, A. A. L., SUTRA, R. C. C., LIRA, R. G. P., CLEMENTINO, M. R. A.; CARVALHO. A. L. M. Revalidação de um sistema de tratamento de água: Ações estratégicas da garantia da qualidade em uma indústria farmacêutica. *Revista Brasileira de Farmácia*. Rio de Janeiro, v. 89(2), p. 168-171, 2008.

YAMAMOTO, C. H., PINTO, T. J. A., MEURER, V. M., CARVALHO, A. M., REZENDE, P. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata,

MG. In: Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária Belo Horizonte. Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF e Universidade de São Paulo – USP, 12 a 15 de setembro de 2004.

CAPÍTULO XXI

CONTAMINAÇÃO E ADAPTAÇÃO MICROBIANA EM BIOFÁRMACOS: UM ESTUDO DE REVISÃO

Tacilene Luzia da Silva¹

Diego Rodrigues Cravo Teixeira²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

Marina Galdino da Rocha Pitta²

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: tacy-19@hotmail.com

RESUMO – *Biofármacos são macromoléculas complexas, obtidas de fontes biológicas utilizadas para fins terapêuticos e diagnósticos. Esses fármacos são fundamentalmente diferentes dos fármacos convencionais, apresentam elevado peso molecular e sensibilidade a várias vias de degradação. O processo produtivo dessa classe de medicamentos é bastante complexo e apresentam características particulares, tais como a utilização de açúcares, sais, fontes de carbono e substratos de origem animal. Conhecer as fontes de contaminação é fundamental para promover medidas de controle e assegurar uma produção isenta de contaminantes. Determinar a formulação e os conservantes adequados às propriedades*

físico-químicas e as vias de instabilidade da proteína de interesse, é outra etapa bastante importante. Diante disso, a proposta deste trabalho é descrever as principais características dos biofármacos, e os principais fatores relacionados à contaminação e adaptação microbiana.

Palavras chave: Medicamentos biológicos; Macromoléculas; Micro-organismos

1. INTRODUÇÃO

Os peptídeos e as proteínas apresentam grande potencial terapêutico, e importante parte da indústria farmacêutica. O progresso da biotecnologia, aplicada à produção de fármacos aumentou o número de proteínas no mercado, principalmente para o tratamento de doenças crônicas (HERMELING et al., 2004; AKASH et al., 2013; IBRAHIM et al., 2013; KARACALI et al., 2014). Esses fármacos são fundamentalmente diferentes dos convencionais, em geral apresentam peso molecular até 1.000 vezes maior, sensibilidade a várias vias de degradação, alta heterogeneidade e também propriedades imunogênicas (SEKHON, 2010).

Assim como, as características moleculares, a produção desses medicamentos é bastante complexa e envolve uma série de processos altamente susceptíveis a contaminação microbiológica (SUVARNA et al., 2011). Apesar disso, deve-se assegurar durante todo o processo produtivo que a carga microbiana estará em níveis baixos, a fim de evitar danos a saúde dos pacientes e de enquadrar o produto nos compromissos de regulamentação e requisitos de conformidade (SINGH, 2007).

A redução na eficácia do sistema conservante, provocada por interações com as proteínas ou outros excipientes presentes na formulação, pode contribuir para o crescimento dos microrganismos (BONTEMPO, 1997; MATTHEWS et al., 1999). Além disso, a capacidade que os microrganismos possuem de se reproduzir rapidamente e se adequar as condições adversas do ambiente, pode favorecer a adaptação microbiana nessa classe de medicamentos (ARAÚJO et al., 2011). Diante disso, conhecer as fontes de contaminação é fundamental para promover medidas de controle e assegurar uma produção isenta de contaminantes (SURVANA et al., 2011).

A proposta deste trabalho é descrever as principais características dos biofármacos, e os principais fatores relacionados à contaminação e adaptação microbiana.

Características Moleculares

Biofármacos são macromoléculas complexas, obtidas de fontes biológicas e utilizadas para fins terapêuticos e diagnóstico. Esses fármacos são fundamentalmente diferentes dos fármacos convencionais, geralmente apresentam peso molecular de 100 a 1000 vezes maior, sensibilidade a várias vias de degradação e alta heterogeneidade, além de apresentar características imunogênicas (SEKHON, 2010).

Produção

A matéria prima utilizada na produção de medicamentos biológicos consiste principalmente de açúcares, sais, traço, minerais e suplementos. De modo a estimular ao máximo a capacidade metabólica das linhagens celulares escolhidas, mediante o fornecimento de fontes de carbono e

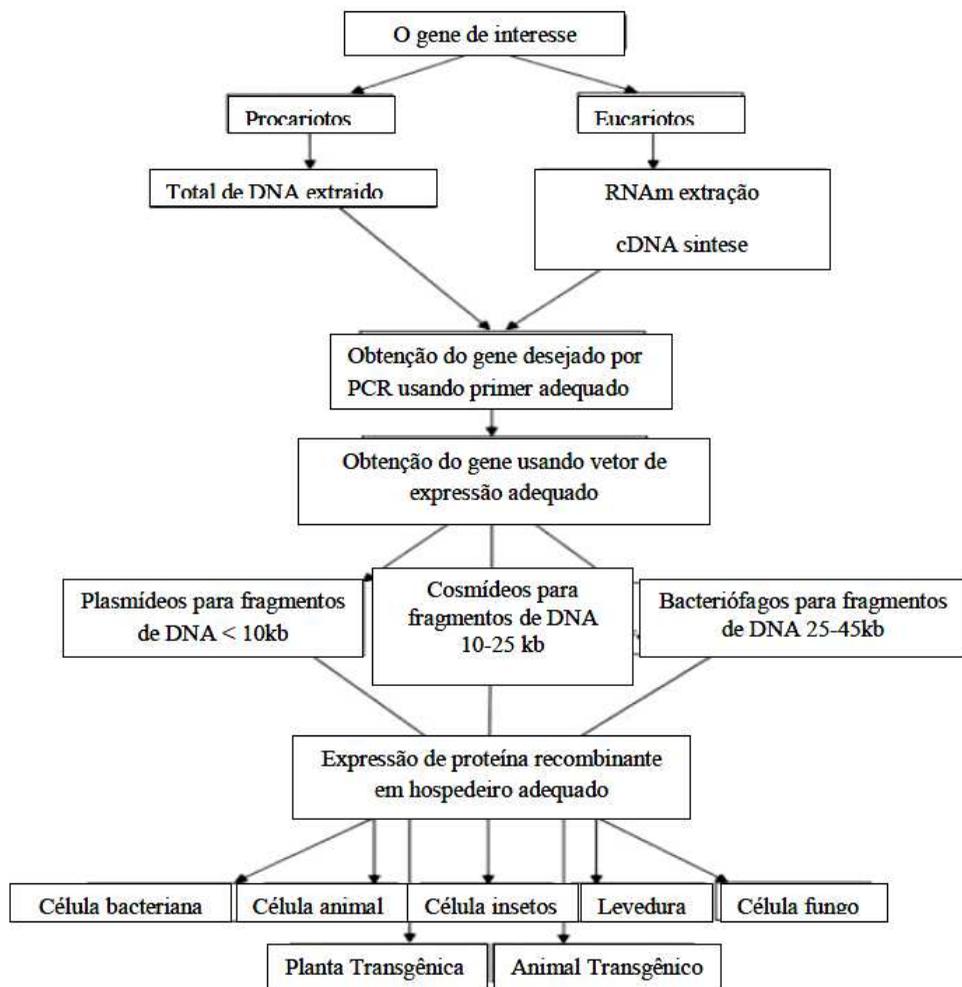
nitrogênio. No entanto, a presença desses nutrientes torna o meio mais propenso ao crescimento de agentes contaminantes que apresentam exigências nutricionais compatíveis (EMILY et al., 2015). Além disso, a produção de medicamentos biológicos envolve a utilização de diversos substratos de origem animal, tais como meios de cultura celular, soros, suplementos que também apresentam alto risco de contaminação por vírus, micoplasmas, bactérias e fungos (FDA, 2011).

As especificidades da matéria prima utilizada na produção de biofármacos, na grande maioria lábil, limita os métodos de esterilização comumente utilizados na indústria farmacêutica convencional, sendo substituídas por outras alternativas, tais como filtração e tratamentos térmicos de curta duração (KNABLEIN, 2005).

É necessário definir a proteína de interesse e obter a sequência de DNA que a codifica, depois da determinação e do isolamento do gene de interesse, é necessário selecionar o tipo de célula que será utilizado no cultivo. Em geral, na escolha do sistema de expressão é avaliada a produtividade, qualidade e as características da proteína que será produzida (LI et al., 2010). A escolha da linhagem causa grande impacto no custo e na produtividade do processo de produção. Nesse estágio, a sequência genética pode ser otimizada para melhorar sua interação com a linhagem hospedeira escolhida. Cada pequena alteração na proteína-alvo pode modificar suas propriedades, gerando a necessidade de revalidação (HOELDER et al., 2012).

O processo para o desenvolvimento de uma linha celular estável começa com a construção de vetor de expressão e de transfecção. Depois de ser transfectada com plasmídeos que contém o gene, marcador de seleção e promotores para intensificar a expressão (DEER; ALLISON, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática do processo de produção de proteína recombinante.



Fatores de contaminação

O conhecimento das fontes para os agentes causadores da contaminação é fundamental para promover medidas de controle e assegurar uma produção isenta de contaminantes. Os principais fatores de contaminação são: Matéria Prima, Água e Ambiente de Produção.

Matéria Prima

A matéria prima utilizada na produção de medicamentos biológicos, consiste principalmente de açúcares, sais, traço, minerais e suplementos, de modo a estimular ao máximo a capacidade metabólica das linhagens celulares escolhidas, mediante o fornecimento de fontes de carbono e nitrogênio. No entanto, a presença desses nutrientes torna o meio mais propenso ao crescimento de agentes contaminantes que apresentam exigências nutricionais compatíveis (EMILY et al., 2015). Além disso, a produção de medicamentos biológicos envolve a utilização de diversos substratos de origem animal, tais como meios de cultura celular, soros, suplementos que também apresentam alto risco de contaminação por vírus, micoplasmas, bactérias e fungos (FDA, 2011).

As especificidades da matéria prima utilizada na produção de biofármacos, na grande maioria lábil, limita os métodos de esterilização comumente utilizados na indústria farmacêutica convencional, sendo substituídas por outras alternativas, tais como filtração e tratamentos térmicos de curta duração (KNABLEIN, 2005).

Dessa forma, a adoção de um criterioso controle de qualidade e adesão as Boas Práticas de Fabricação (ILL; DEHGhani, 2009), assim como a utilização de matérias-

primas qualificadas são essenciais para reduzir os riscos de contaminação (FDA, 2011).

Água

A contaminação microbiológica da água representa uma grande preocupação à indústria farmacêutica, devido à possibilidade de impactos negativos na qualidade do produto. Além disso, a água representa uma importante fonte para a contaminação cruzada durante a fabricação de medicamentos (MATHIAS, 2013).

A produção de biofármacos envolve um expressivo volume de água, devido ao processo de cultura de células e purificação (EMILY et al., 2015). Além do que, maior parte dos biofármacos é injetável, o que exige um maior rigor durante o controle, já que o grau de qualidade da água deve estar em conformidade com o uso farmacêutico (KEIZER et al., 2010).

As fontes de água e a água tratada devem ser constantemente monitoradas para identificação de possíveis contaminantes, inclusive das endotoxinas produzidas pelas bactérias. Para garantir a eficácia desse controle, o desempenho dos sistemas de purificação, armazenamento e distribuição também devem ser analisados rigorosamente. O abastecimento deverá ser realizado sob pressão positiva contínua, com encanamento em perfeito estado de modo a evitar a entrada de quaisquer tipos de contaminação.

Ambiente de Produção

O ambiente de produção envolve, os sistemas de fluxos, procedimentos de limpeza, ar, superfície, instrumentos, pessoal e equipamentos (LOTFIPOUR; HALLAJ, 2012). O controle das variáveis relacionadas ao ambiente está

diretamente implicado na qualidade e segurança dos produtos biológicos.

Para proteger os fármacos da contaminação, os procedimentos mais críticos são realizados em ambientes controlados, onde são instaladas barreiras para evitar a entrada de partículas e microrganismos, um exemplo disso é a instalação de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air resistance) (DENYER; BAIRD, 2007).

O tipo de filtro instalado dependerá da quantidade de partículas viáveis e também da quantidade de UFC (unidades formadoras de colônias) permitidas no ambiente, dessa forma, podemos definir diversas classes de salas limpas como exemplificado no quadro 2.

Tabela 1 – Graus quarto limpos de acordo com o número de microrganismos viáveis e o número de partículas.

Grau quarto limpo	Número máximo de partículas permitido/ m ³	Número máximo permitido de UFC de microrganismos viáveis na amostra de ar/ m ³
A	3500	< 1
B	3500	10
C	350000	100
D	3500000	200

Fonte: Lotfipour&Nezhadi, 2012

As operações mais expostas e potencialmente propensas a contaminação microbiológica, como a preparação de inóculo e enchimento asséptico são geralmente realizadas

no grau (A). O contato do microrganismo com esse tipo de produto deve ser evitado ao máximo, já que os mesmos podem excretar proteases e toxinas, que podem alterar o princípio ativo dos fármacos ou causarem danos aos pacientes, se não forem identificados e removidos nas outras fases do processo (LOTFIPOUR; NEZHADI, 2012).

Conservantes

Os conservantes antimicrobianos são substâncias adicionados a produtos farmacêuticos para prevenir ou retardar a deterioração microbiana da formulação. As categorias dos conservantes tradicionais incluem álcool, amidas e aminas, doadores de formaldeído, ésteres de parabeno, derivados de fenol, piridina e compostos quaternários (MOWAD, 2001).

Apesar dos benefícios o uso de conservantes antimicrobianos nas formulações de proteínas terapêuticas, assim como os demais excipientes anteriormente citados, é potencialmente capaz de alterar a estabilidade das proteínas. As interações entre proteínas e conservantes podem causar mudanças na conformação, aumento da agregação, alterações nas propriedades químicas e redução da tolerância a altas temperaturas.

Em contrapartida, o inverso também pode ocorrer, os conservantes possuem grupos funcionais reativos e podem ter sua eficácia comprometida devido interações não só com as proteínas, mas também com os ingredientes, excipientes, recipientes e também devido à instabilidade físico-química da proteína terapêutica. Atualmente, os conservantes mais comumente utilizados em proteínas e peptídeos terapêuticos são m-cresol, fenol e álcool benzílico.

2. CONCLUSÕES

Biofármacos são macromoléculas complexas, estando sua atividade biológica, eficácia e segurança condicionada à dobragem correta e manutenção de suas estruturas tridimensionais. Apresentam elevado peso molecular, sendo a via parenteral mais adequada para administração, logo que pode ocorrer degradação enzimática no trato gastrointestinal se administrado pela via oral;

As principais fontes de contaminação relacionadas na produção de biofármacos são as matérias primas, água e ambiente de produção;

A produção dos biofármacos possui características particulares, tais como a utilização de açúcares, sais, fontes de carbono e substratos de origem animal, que são potencialmente susceptíveis a contaminação por microrganismos;

A utilização de um conservante inadequado pode acarretar em interações e perda da eficácia do mesmo, favorecendo o crescimento microbiano, em caso de contato com contaminantes. Além disso, a utilização de concentrações sub-inibitórias pode causar apenas danos superficiais e induzir o desenvolvimento de uma resistência adaptativa nos microrganismos.

3. REFERÊNCIAS

AKASH, MSH; Rehman K, Chen S Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem* 114: 525–531, 2013.

ARAÚJO, P; et al. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against microbial*

pathogens: communicating current research and technological advances, p. 826-834, 2011.

BONTEMPO, JA. Formulation development ed. Development of Biopharmaceutical Parenteral Dosage Forms. New York, NY: Marcel Dekker;109-142. 1997.3898–911. 2006

DEER, JR; Allison DS. High-level expression of proteins in mammalian cells using transcription regulatory sequences from the Chinese hamster EF-1 alpha gene. Biotechnol Prog ; 20:880–889, 2004.

DENYER, S. P; Baird, R. M. Guide to Microbiological Control in Pharmaceut-icals and Medical Devices. second ed: CRC Press, 2007.

EMILY, A. Peterson, Julie B. Manley Green. Chemistry Strategies for Drug Discovery, Medical, p.157, 2015. FDA. What is biological product?. Available from: 2011

HERMERLING, S; et al. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. Pharm Res 21: 897–903, 2004.

HOELDER, S; Paul A. Clarke e Paul Workman. Descoberta de pequenas drogas contra o câncer de moléculas: sucessos, desafios e oportunidades. MolOncol; 6 (2): 155-176, 2012.

IBRAHIN, M; et al. Acetyl and butyryl cholinesterase inhibitory sesquiterpene lactones from Amberboaramosa. Chem Cent J 7: 116 , 2013.

ILL CR, DEHGHANI H. Risk reduction in biotherapeutic products. *Curr Opin Drug DiscovDevel.* Mar;12(2):296-304, 2009.

KARACALI, S, İzzetoğlu S, Deveci R . Glycosylation changes leading to the increase in size on the common core of N-glycans, required enzymes, and related cancer-associated proteins. *Turk J Biol* 38: 754–771, 2014.

KEIZER, R. J; et al. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical Pharmacokinet*, n. 49, v. 8, p. 493-507, 2010.

KNABLEIN, J. *Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.*

LI, Feng; et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production. 2(5):466-79. Sep 1. Epub, 2010.

LOTFIPOUR, Farzaneh; Hallaj-Nezhadi.Somayeh. *Microbial Quality Concerns for Biopharmaceuticals.* 2012.

MATHIAS, Eulambius. Pharmaceutical product cross-contamination: industrial and clinical pharmacy practice.19(2), p.17-19, 2013.

MATTHEW, RB. Regulatory Aspects of Stability Testing in Europe. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25:831-856, 1999.

MOWAD CM. Uma abordagem prática para corrigir testes para cosméticos alergênicos. *DermatolTher.* 14 : 188-93, 2001.

SEKHON, Bhupinder S. Biopharmaceuticals: an overview. *Thai J. Pharm. Sci.* 34, 1-19, 2010.

SINGH, A; et al. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25 , 99-121, 2007.

SURVANA, Kalavati; et al. Case Studies of Microbial Contamination in Biologic Product Manufacturing. p. 50-56, 2011.

CAPÍTULO XXII

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Thiago David dos Santos Silva¹

Antônio Felix da Silva Filho²

Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho³

Maira Galdino da Rocha Pitta⁴

Michelly Cristiny Pereira²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo⁴

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: thiagodavid_10@hotmail.com

RESUMO- *A extração e quantificação de proteínas é um importante método empregado em diversas instâncias industriais, agropecuárias e de produtos alimentícios. Neste contexto, esta revisão tem como objetivo descrever os principais métodos de quantificação e extração protéica e evidenciar as qualidades técnicas individualmente. Para isto, foram pesquisados artigos científicos publicados em texto*

integral, até o ano de 2014, nas seguintes bases de dados: MEDLINE, Scielo, PubMed e Science direct. A partir deste levantamento literário, foram encontrados 6.285 artigos que possuíam metodologias de quantificação ou extração detalhadas ou mesmo textos abordando o tema "quantificação/extração protéica. A partir de todo o conteúdo analisado, foi possível observar que: os métodos físicos apresentam vantagens, tais como não requerer a adição de outros agentes químicos, e desvantagens, a exemplo da geração de calor que pode promover a desnaturação das enzimas de interesse; os métodos químicos, apesar da eficiência na ruptura do envoltório celular, geralmente conferem ao sistema condições drásticas, como mudanças de pH; os métodos enzimáticos são mais dispendiosos, porém se tornam opções importantes no caso dos demais tratamentos não fornecerem resultados satisfatórios. Diante do exposto, concluiu-se a inexistência de um procedimento de quantificação universal, devendo àqueles interessados, levar em consideração os critérios essenciais e específicos do protocolo.

Palavras chave: Proteínas, Bradford, Kjeldhal.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos microrganismos, localização dentro da célula, estabilidade e da finalidade da extração (Kula, 1987; Pandit et al., 2005). Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes podem ser aplicados. Os métodos químicos são

difícultosos, pois implicam na necessidade de remoção de resíduos, aumentando os custos de produção. Por outro lado, os métodos mecânicos e físicos de ruptura celular não implicam em riscos de toxicidade, pois não incluem produtos químicos no extrato enzimático (Rech et. al.,1999).

Quanto a quantificação de proteínas, trata-se de um método empregado em análises clínicas, nutrição animal, ciência de alimentos, entre outros. Na química de proteínas, a quantificação é fundamental para o acompanhamento do processo de purificação e análises físico-químicas posteriores. Segundo Zaia et al., (1998), o principal fator a ser considerado na escolha do método de quantificação é o conhecimento acerca dos constituintes da amostra e de suas concentrações, o que facilita na identificação de possíveis interferentes (Zaia et al., 1998).

O presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa realizada em bases de dados secundários de domínio público. Foram consultadas no presente trabalho as publicações com acesso às seguintes bases de dados: MEDLINE, Scielo, PubMed, e Science direct. Foram procurados artigos científicos publicados em texto integral, até o ano de 2014, usando os seguintes descritores: Proteínas – 4.492 artigos, Extração – 1712 artigos, Células de eucariotos – 81 artigos.

1.1 Procedimentos de Extração de Proteínas

Existem vários procedimentos descritos na literatura para a extração de proteínas. Esses procedimentos estão relacionados com o objetivo da extração, como, por exemplo, para se aferir concentrações, determinação de atividade enzimática, ou ainda para separação por técnicas de eletroforese(Zaia et al., 1998).

Os três passos fundamentais no preparo de amostras de proteínas são rompimento celular, inativação ou remoção de interferentes e solubilização das proteínas (Herbert, 1999; Rabilloud et al., 1999; Shaw & Riederer, 2003; Lehninger et al., 1995; Pimenta, 2003).

O rompimento celular pode ser obtido tanto por procedimentos químicos como físicos, dependendo da natureza da amostra e do tipo de análise que se deseja utilizar. Vários procedimentos de lise, destruição celular por rompimento da membrana, podem ser utilizados, como, lise osmótica (quando a célula é suspensa em um meio hipotônico e seu volume sendo aumentado até ocorrer a lise da membrana), lise por detergentes e lise enzimática da parede celular (Elias et al., 2004).

Além desses, também se utilizam a agitação e a maceração a várias temperaturas (ambiente, a zero grau Celsius ou com nitrogênio líquido). Em amostras sólidas, geralmente, emprega-se a maceração manual sob nitrogênio líquido para transformar a amostra em um pó fino. Pode ser usada também a trituração com sonda de aço, capaz de promover a homogeneização do material, além de cortá-lo em pequenos pedaços. Para amostras líquidas, utiliza-se ultrassom (ou sonicação) para homogeneizar o material e romper as células, além da centrifugação (Voet et al., 1999; Magalhães & Arruda, 2007). As ondas ultrassônicas de alta potência (< 1 W a milhares de W cm⁻²) causam permanente mudança física e química porque produzem cavitação e micro fluidos nos líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (Barboza & Serra, 1992).

A propagação das ondas ultrassônicas no meio reacional cria uma variação de pressão, a qual é responsável pela cavitação, que pode ser definida como a formação e

implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido. A variação de pressão cria, num ponto do líquido, momentos de compressão e descompressão alternados (Barboza & Serra, 1992). A cavitação acústica envolve três estágios: formação de núcleos de cavitação, crescimento das bolhas e violentas implosões (Flynn, 1964; Bremmer, 1990; Barbosa & Serra, 1992). No momento da implosão, há formação de ondas de choque e na fase final esperam-se, no centro da bolha, temperatura e pressão muito elevadas, da ordem de 10000 K e 1000 atm (Bremmer, 1990; Barbosa & Serra, 1992). Nos sistemas heterogêneos, nas interfaces sólido-líquido, a natureza da destruição das bolhas se apresenta diferente. A destruição se faz de forma não simétrica, dando origem a um jato de líquido dirigido para a superfície sólida. Além disso, micro fluxos de líquido são formados devido à absorção de grande quantidade de energia vibracional dentro de pequeno volume, com pouco ou nenhum aquecimento associado. Isto favorece o transporte de massa entre a fase líquida e as superfícies sólidas, contribuindo para a aceleração da velocidade da reação (Barboza & Serra, 1992). Assim, a eficiência da extração de um analito depende das variáveis que influenciam no processo no processo de cavitação (temperatura, viscosidade, presença de partículas sólidas, altura da coluna de água, frequência e posição dos frascos dentro do banho). Tão logo as condições experimentais estejam otimizadas, o processo de ultrassom é bastante eficiente para a extração sólido-líquido (Barboza & Serra, 1992; Nascentes et al., 2001).

Como exemplo de estudo de procedimentos de rompimento celular, Chan et al., 2002 otimizaram as condições de preparo de amostras para análise por eletroforese em duas dimensões de *Prorocentrum triestinum*, um dinoflagelado. Eles reconheceram que o primeiro passo

do preparo da amostra era o rompimento celular para a liberação de todo o conjunto de proteínas do organismo. Na amostra em estudo, seriam necessários métodos mais vigorosos de rompimento celular, uma vez que os dinoflagelados são encapsulados por paredes celulares robustas. Para isto, eles propuseram o uso da sonicação e da agitação vigorosa com o uso de lâminas de vidro num agitador de vidro. Foi tomada aproximadamente uma massa de 150 mg de células de *P. triestinum*, previamente centrifugada e homogeneizada num tampão Tris-HCl resfriado (4°C), que foi submetida à agitação com as lâminas de vidro ou à sonicação. Ao se compararem os resultados pelos dois métodos, os autores obtiveram aumento de 5% quando utilizaram a sonicação na extração de proteínas por peso úmido de amostra em relação à extração quando utilizaram as lâminas de vidro. Considerando que os resultados mostraram padrões similares ao se compararem os géis de eletroforese em duas dimensões, os autores elegeram a sonicação como o método mais efetivo de rompimento celular para os dinoflagelados (Chan et al., 2002).

1.2 Métodos de Determinação de Proteínas Totais

Existem vários métodos para a determinação de proteínas totais, que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contém detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), soluções de proteína pura (absorção UV), indústria de alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), entre outras. Cada método apresenta um princípio distinto.

Método Biureto - O método Biureto (Gornall et al., 1949) envolve a mistura de sulfato de cobre e hidróxido de sódio com tartarato de sódio, que estabiliza o cobre em solução. Segundo Zaia et al. (1998), ocorre a formação de um complexo quadrado planar do cobre, com a ligação peptídica da proteína, em meio alcalino. Apresenta limite de detecção de 1×10^{-3} mg.L⁻¹, leitura de absorvância em 310 nm e sensibilidade de 0,5 a 1mg por mL (Wilson & Walker, 1995). O método descrito por Itzahki & Gill (1964) utiliza somente sulfato de cobre e hidróxido de sódio na formação do complexo (Itzahki & Gill, 1964). O complexo formado no método do Biureto também pode ser lido a 540 nm, porém com menos sensibilidade.

Método de Lowry - O método de Lowry apresenta limite de detecção de 0,3 mg.L⁻¹, sensibilidade de 0,1 a 0,3 mg por mL, leituras de absorvância em comprimento de onda 750 nm (Lowry et al., 1951). Neste método, ocorre redução dos constituintes ativos do reagente folinfenol por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos que contribuem com quatro elétrons ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas, tornando a reação biureto mais sensível (Zaia et al., 1998).

Método de Bradford - No método de Bradford, as leituras são feitas a 595 nm, o limite de detecção é de 2×10^{-5} mg.L⁻¹ e Sensibilidade de 0,06 a 0,3 mg por mL (Bradford, 1976; Wilson & Walker, 1995). Ocorre ligação do corante azul de Coomassie BG-250 com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter estrutura macromolecular, ou seja, de 8-9 ligações

peptídicas no mínimo (Bradford, 1976). Segundo Zaia et al. (1998), a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

Método BCA - Ácido Bicinconínico - No método BCA, com leituras a 562 nm, limite de detecção de 0,5 mg.L⁻¹ e sensibilidade de 0,1 a 0,5 mg por mL, ocorre formação de complexo colorido com BCA, pela redução do Cu⁺², em meio alcalino, com proteínas (Zaia et al, 1998). Smith et al. (1985), declararam que este método monitora os íons cobre monovalentes produzidos na reação de proteínas com cobre bivalente, aumentando a sensibilidade do método, como ocorre no de Lowry. Existem outras substâncias capazes de reduzir o Cu⁺² a Cu⁺¹ tais como ácido úrico e glicose que causam interferência na determinação (Wilson; Walker, 1995).

Método da Proteína Bruta - O método da proteína bruta é baseado na determinação do nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e consequente multiplicação por 6,25 (Apha, 1999; James, 1995). Este fator é referente à média de nitrogênio proteico de 16% presente nos compostos. Neste método o limite de detecção é de 0,1 mg.L⁻¹.

Para Zaia et al. (1998), vários fatores podem ser analisados antes da escolha da metodologia para determinação de proteína total, como sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade, poucas substâncias interferentes, disponibilidade de volume de amostra, rapidez, baixo custo, similaridade às concentrações ambientais e toxicidade do reagente (Zaia et al., 1998).

1.3 Inativação ou Remoção de Interferentes

Durante ou após o rompimento celular, vários compostos interferentes como enzimas proteolíticas (proteases), sais, ácidos nucleicos, polissacarídeos, fenóis e/ou proteínas muito abundantes precisam ser removidos ou inativados. Destes, os que mais causam interferências ou erros nas determinações são os sais e as proteases. Inibidores de proteases são usualmente adicionados para impedir a degradação das proteínas, mas podem modificá-las, causando erros nas análises (Görg et al., 2005). Como alternativa, pode-se levar a amostra ao ponto de ebulição num tampão com dodecil sulfato de sódio (SDS /sem uréia) ou inativar as proteases com valores de pH baixo (por exemplo, precipitando com ácido tricloroacético–TCA) (Görg et al., 2005).

A precipitação das proteínas com ácido tricloroacético/acetona (TCA/AC) é muito útil para minimizar a degradação destas e remover compostos interferentes, tais como sais ou polifenóis. Entretanto, é importante ressaltar que podem ocorrer perdas de proteínas devido à precipitação ou ressolubilização incompleta. Além disso, pode-se obter um conjunto completamente diferente de proteínas extraídas do tampão de lise, dependendo se utilizada uma etapa prévia de precipitação ou não (Görg et al., 2000).

A remoção de sais pode ser obtida por diálise, ou como já dito acima pela precipitação de proteínas com TCA ou solventes orgânicos (acetona à 0°C) (Berkelman & Stenstedt, 1998). Grandes quantidades de lipídeos podem interagir com proteínas da membrana e consumir detergentes. A remoção de lipídeos pode ser realizada pela extração com solventes orgânicos. Neste caso, podem ocorrer perdas

significativas de proteínas se estas forem solúveis em solventes orgânicos (Görg et al., 2005). Alternativamente, pode ser empregada a centrifugação a alta velocidade (Fountoulakis, 2004), seguida da remoção da camada lipídica.

Todas as metodologias aqui descritas possuem vantagens e desvantagens que não se restringem apenas ao tempo e especificidade. Muitas delas possuem também a capacidade de gerar diversos interferentes que resultam em ligações inespecíficas e resultados não reprodutíveis. Sendo recomendável, portanto, análise detalhada do procedimento bem como padronização das condições de cada reação.

Interferentes no Método de Biureto

Verifica-se que o método de biureto (Gornall et al., 1949) está sujeito à interferência de substâncias que possam reagir com os íons cobre (II). Na tabela 1, estão listados alguns interferentes; os métodos para sua eliminação variam conforme o caso, no entanto, recomenda-se a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético e posterior solubilização para determinação das mesmas.

Tabela 1 - Substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de biureto.

INTERFERENTES	CAUSAS
Bilirrubina	Absorve em 540 nm, sério interferente acima de 70 mg/L.
Amônio	Sulfato de amônio usado como precipitante de proteínas; em meio alcalino amônia complexa cobre.
Lipídios	Provoca turbidez nas amostras, com consequente aumento da absorção das mesmas
Hemoglobina	Aumenta a absorção das amostras.
Dextran-40 e 70	Causa turbidez nas amostras, em meio alcalino com tartarato, devido à formação de um complexo insolúvel entre o dextran e cobre
Peptídeos e aminoácidos livres (His, Ser, Thr)	Reagem com cobre, sendo interferente em métodos baseados em cinética de reação.
Melanina	Provoca falso positivo
Tampão tris-HCl e glicose	Reage com o cobre presente no reativo biureto.
Lactose	Provoca falso positivo
Amido	Provoca falso positivo

Interferentes no Método de Lowry

Apesar do método de Lowry e cols. (1951) apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absorvibilidade específica altamente variável para diferentes proteínas, e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas. É Recomendado aquecer a amostra, por 3 minutos, a 37°C, após a adição de sulfato de cobre alcalino, e por mais três minutos, após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu.

Tabela 2 - Substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Lowry e cols.

INTERFERENTE: CAUSAS

Compostos fenólicos	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.
Lipídios	Provocam turbidez das amostras
Detergentes	Provocam a formação de precipitado
Ácido úrico	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo
Guanina e xantina	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo
Sulfato de amônio	Diminui a absorvibilidade devido à alteração do pH da amostra.
Melanina	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo
Bilirrubina	Aumenta a absorção da amostra

4-metilumbeliferor	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo
Mercaptanas e cisteína	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.
Tampão tris-HCl	Reage com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo
Açúcares	Reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu resultando em falso positivo.
RNA	Aumenta a absorção das amostras

Interferentes no Método de Bradford

Apesar do método de Bradford (1976) ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry e cols (1951), o mesmo apresenta desvantagens, tais como: a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade (Marshall & Williams, 1992; Fountoulakis et al., 1992) ou baixo peso molecular das mesmas (Huang, 1988); e fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-25. Este varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido.

Tabela 3 - Substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Bradford.

INTERFERENTES	CAUSAS
Tolbutamida	Provoca falso positivo
Uréia	Fornecer resultado falso positivo, acima 45 g/L
Cloreto de sódio e de potássio	Fornecem resultado falso negativo, acima de 1 M
Detergentes (Triton X-100, SDS, Tween-20)	A larga banda de absorção em 650 nm, devido a reação entre o corante e os detergentes, interfere na banda em 595 nm, resultando em falso positivo
Ciclodextrinas	Formam um complexo de inclusão com corante BG- 250, resultando em falso positivo
Polifenóis e polifenóis oxidados	Reagem com as proteínas impedindo a formação do complexo das mesmas com o corante BG-250.
2-mercaptoetanol + guanadina	Diminuem a absorção da amostra.
Glicerol	Provoca falso positivo.
Lipídios	Causam turbidez na amostra.
Cloropromazina	Provoca falso positivo.
Fluoreto	Diminui a absorção da amostra.

Interferentes do Método de BCA

O método de Smith e cols (1985) possui desvantagens, como a dependência da temperatura de incubação das amostras, a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e a variação da absorbância com o tempo (Fountoulakis et al., 1992). É recomendando, portanto, um rígido controle no tempo de leitura das amostras, após a incubação das mesmas.

Tabela 4 - Substâncias que interferem na determinação de proteínas totais pelo método de Smith e cols (BCA).

INTERFERENTES	CAUSAS
Açúcares em geral	Provocam parcial redução do cobre resultando em falso positivo.
EDTA	Complexa íons cobre (II)
Lipídios	Reação entre BCA e lipídios resulta em falso positivo
Sulfato de amônio	Resulta falso negativo
Mercaptoetanol e dithiothreitol	Provocam redução do cobre (II) resultando em falso positivo
Peróxido de hidrogênio	Reação entre BCA e peróxido de hidrogênio resulta em falso positivo
Vitamina C e paracetamol	Provocam redução do cobre (II) resultando em falso positivo
Clorpromazina	Provoca turbidez na amostra.
Penicilinas	Provocam falso positivo

Interferentes do Método de Proteína Bruta

Este método está sujeito a muitos interferentes, sendo que qualquer substância que apresente uma banda de absorção na região de leitura é um interferente em potencial. Este fato fez com que esta metodologia fosse utilizada somente em processos de purificação de proteínas, onde uma avaliação semiquantitativa é suficiente, na maioria dos casos.

Solubilização de Proteínas

Após o rompimento celular e a remoção dos compostos interferentes, os polipeptídeos devem ser solubilizados e, dependendo da finalidade da análise, desnaturados e reduzidos para romper as interações intra e intermoleculares. A solubilização da amostra é geralmente realizada com um tampão contendo compostos caotrópicos (uréia ou tiouréia), detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (por exemplo, Triton X-100), agentes redutores, anfólitos e inibidores de protease. O tampão de solubilização mais popularmente usado é o de O'Farrell, tal qual descrito ou com modificações (O'Farrell, 1975).

Dentre os compostos caotrópicos, a uréia é bastante eficiente no processo de ruptura de ligações de hidrogênio. Este desnatura as proteínas pelo rompimento das ligações não covalentes e iônicas entre os resíduos de aminoácidos (Shaw & Reiederer, 2003), levando ao desdobramento e desnaturação da proteína. Em contraste, a tiouréia é muito adequada para a quebra das interações hidrofóbicas, aumentando a solubilização de proteínas de membranas hidrofóbicas (Molloy et al., 1998; Rabilloud et al., 1998). Atualmente, a solução mais indicada para solubilização de proteínas hidrofóbicas é um tampão com uma combinação de

5 a 7 mol L⁻¹ de uréia e 2 mol L⁻¹ de tiouréia, com os detergentes apropriados.

Os detergentes são utilizados para impedir as interações hidrofóbicas entre os domínios de proteínas hidrofóbicas, evitando a perda destas devido à agregação e precipitação. A solubilização de proteínas em solução contendo o detergente aniônico SDS, à temperatura de ebulição, tem sido recomendada (Harder et al., 1999; Boucherie et al., 1995). Entretanto, a concentração crítica para o uso do SDS é abaixo de 0,2% (m/v), tornando, assim, recomendável a troca desse detergente por outro não-iônico, como NP-40 ou Triton X-100 (apesar de não serem tão efetivos para a solubilização de proteínas hidrofóbicas de membrana como o SDS) ou por detergentes zwitteriônicos, como sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) ou sulfobetainas (SB 3-10 ou ASB 14) (Görg et al., 2005).

Os agentes redutores promovem a redução e a prevenção da re-oxidação das pontes dissulfeto. Eles são necessários na clivagem das pontes intra e intermoleculares dissulfeto para se obter um desdobramento completo da proteína. Os redutores mais comumente usados são o 1,4 ditioneitol (DTT), o ditioeritritol (DTE) e o 2-mercaptoetanol (Rabilloudet al., 1996). Existem outras indicações de redutores como: a tributilfosfina (TBP) e o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (Hoving, 2002), mas a escolha do DTT e DTE é predominante (Herbert et al., 1998, Getz et al., 1999).

Chan e colaboradores (2002), também testaram várias combinações do uso de uréia e tiouréia como agentes caotrópicos para a solubilização das proteínas do *P. triestinum*. Eles usaram tampões com concentrações de 9,5 mol L⁻¹ de uréia, 8 mol L⁻¹ de uréia e as combinações de 2

mol L⁻¹ de tiouréia com 5 mol L⁻¹ de uréia e, por último, 2 mol L⁻¹ de tiouréia com 7 mol L⁻¹ de uréia. Também estudaram os efeitos da adição de três redutores (DTT, TBP e TCEP) nos tampões de re-hidratação (64 mmol L⁻¹ de DTT, 2 mmol L⁻¹ de TBP e 4 mmol L⁻¹ de TCEP) e de equilíbrio, com ou sem o agente alquilante iodoacetamida (0,26 mol L⁻¹). Eles observaram um aumento no número de spots nos géis de eletroforese ao se utilizar uréia e um aumento ainda maior ao se utilizar a combinação de uréia e tiouréia, atribuindo esses aumentos ao efeito de solubilização da uréia e da tiouréia. Quanto aos agentes redutores, eles observaram que o gel onde utilizaram o tampão com TCEP apresentou melhor resolução em comparação com os outros agentes e desaconselharam o uso do tampão com iodoacetamida na última etapa de equilíbrio, por provocar a perda de proteínas de baixa massa molar (Chan et al., 2002).

Outros métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas totais

Zaia e colaboradores (1993), propuseram uma metodologia básica utilizando p-benzoquinona (PBQ), para a determinação de proteínas em diversos meios. O método se baseia no fato de que o produto de reação entre PBQ e proteínas absorvem em 350 nm. Esta metodologia mostrou-se 10 vezes mais sensível que o método de biureto de menor custo que o de Lowry e cols., e mais rápida que os métodos de Lowry e Kjeldahl (Zaia et al., 1993).

Krystal e colaboradores (1985), propuseram uma metodologia que é 100 vezes mais sensível que o método de Bradford. Este método está baseado no fato de que prata amoniacal liga-se a proteínas e o produto de reação absorve fortemente em 420 nm (Krystal et al., 1995). Stoscheck

(1987), propôs uma metodologia que é 25 vezes mais sensível que o método de Bradford e 50 vezes mais sensível que o de Lowry. Neste método, o ouro coloidal, na presença de proteínas, desloca o seu máximo de absorção de 535 para 595 nm. Segundo a autora, o método está sujeito a poucos interferentes (Stocheck, 1987). Metodologias que utilizam ouro coloidal ou prata amoniacal, possuem um inconveniente óbvio que é a utilização de reagentes caros; no entanto, Krystal e colaboradores (1985), afirmam que o custo de 10 análises em triplicata é menor que dois centavos de dólar (Krystal et al., 1995).

Soedjak (1994), propôs uma metodologia em que o eritrosin B reage com proteína formado um cromóforo que absorve fortemente em 545 nm. A sensibilidade desta metodologia está entre 2 e 14 µg/mL de proteína, que é a mesma sensibilidade do método proposto por Zaia e colaboradores (1992) (Soedjak, 1994; Zaia et al., 1992).

O método da ninhidrina tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais. Nesta metodologia, as proteínas são submetidas à hidrólise ácida, sendo os aminoácidos liberados determinados com ninhidrina. A desvantagem desta metodologia é o tempo gasto na hidrólise ácida em relação aos métodos comumente utilizados (Moore, 1968; Fountoulakis et. al., 1992).

2. CONCLUSÃO

Diante do exposto conclui-se que tanto os métodos físicos quanto os químicos apresentam vantagens e desvantagens ressaltando que não existe método de quantificação universal, portanto recomenda-se que quando

da escolha do método a ser utilizado, leve-se em conta: a sensibilidade necessária (dependente da concentração protéica); A presença/ausência de determinados aminoácidos, em virtude do mecanismo de funcionamento do método a ser escolhido, ou seja, a especificidade do método; A natureza e concentração de substâncias não-protéicas (possíveis interferentes); A solubilidade proteica nas condições do método; Sua facilidade e reprodutibilidade e por fim sua rapidez e custo.

3. REFERÊNCIAS

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th Edition, 1999.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-Som(I): Influência do Ultra-Som na Química. *Química Nova*, v. 15, p. 302, 1992.

BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. *Amershan Biosciences*, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BREMMER, D. Advances in sonochemistry. *T.J.*, v. 1, 1990.

BOUCHERIE, H.; DUJARDIN, G.; KERMORGANT, M.; MONRIBOT, C.; SLONIMSKI, P.; PERROT, M. 2-dimensional protein map of *saccharomyces-cerevisiae*

construction of a gene protein index. *Yeast*, v. 11, p. 601, 1995.

CHAN, L. L.; LO, S.C. L.; HODGKISS, I. J. Proteomics study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, v. 2, p. 1168, 2002.

ELIAS, F.; LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; KOGIKA, M. M.; MIRANDOLA, R. M. S.; Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. *Cienc. Rural*, v. 34, p. 413, 2004.

FLYNN, H.G. Physics of acoustic cavitation in liquids. *Physical Acoustics*, v. 1, p. 57-172, 1964.

FOUNTOULAKIS, M. Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 23, p. 231, 2004.

GETZ, E. B.; XIAO, M.; CHAKRABARTY, T.; COOKE, R.; SELVIN P. R. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Analytical Biochemistry*, v. 273, 73, 1999.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1037, 2000.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v. 5, p. 826, 2005.

GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p. 751-766, 1949.

HARDER, A.; WILDGRUBER, R.; NAWROCKI, A.; FEY, S.; LARSEN P. M.; GÖRG, A. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 20, p. 826, 1999.

HERBERT, B. R.; MOLLOY, M. P.; GOOLEY, A. A.; WALSH, B. J.; BRYSON, W. G.; WILLIAMS, K. L. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*, v. 19, p. 845, 1998.

HERBERT, B. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 20, p. 660, 1999.

HUANG, C. M. Development and evaluation of an automated dye-binding assay for protein in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.* 1988, 34, 980.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A Micro-Biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem*, v. 9, p. 401-410, 1964.

JAMES, C. S. Analytical Chemistry of Foods. *Blackie Academic & Professional*, 1995.

KRYSTAL, G.; MACDONALD, C.; MUNT, B.; ASHWELL, S.A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding.*Anal. Biochem*, v. 148, p. 451, 1985.

KULA, M. R.; SCHÜTTE H.Purification of proteins and the disruption of microbial cells*Biotechnol. Prog*, 1987.

LEHNINGER, A. B.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*.São Paulo: Sarvier, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; J.Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-276, 1951.

MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts.*Talanta*, v. 71, p. 1958, 2007.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M.Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Anal. Biochem*, v. 204, p. 107, 1992.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; WALSH, B. J.; TYLER, M. I.; TRAINI, M.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis.*Electrophoresis*, v. 19, p. 837, 1998.

MOORE, S.Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction.*J. Biol. Chem*, v. 243, p. 6281, 1968.

NASCENTES, C. C.; KORN, M.; ARRUDA M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal*, v. 69, p. 37, 2001.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 4007, 1975.

PANDIT, A. B.; HARRISON, S.; FARKADE, V. D. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, p. 247, 2005.

PIMENTA, A. M. C. Os desafios do Proteoma. *Ciência Hoje*, v. 192, p. 16, 2003.

RABILLOUD, T., BLISNICK, T., HELLER, H., LUCHE, S., AEBERSOLD, R., LUNARDI, J. E BRAUN BRETON, C. Analysis of membrane proteina by two-dimensional electrophoresis. Comparison of the proteins extracted from normal Plasmodium falciparum – infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis*, v. 20, p. 3603, 1999.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M.; J.Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b -galactosidase by Kluyveromyces marxianus. *Ind. Microbiol. Biotechnol*, v. 23, p. 91, 1999.

SHAW, M. M.; RIEDERER, B.M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, v. 3, p. 1408, 2003.

SOEDJAK, H. S. Spectrophotometric determination of total proteins in blood plasma: a comparative study among dye-binding methods. *Anal. Biochem*, v. 220, p. 142, 1994.

STOSCHECK, C. M. Protein assay sensitive at nanogram levels. *Anal. Biochem*, v. 160, p. 301, 1987.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentals of biochemistry*. London: John Wiley & Sons, 1999.

WILSON, K.; WALKER, J. M. Principles and techniques of practical biochemistry. New York: Cambridge, 1995.

ZAIA, D. A. M.; ROCKENBACH, S. R.; OBARA, M. M.; BARRETO, W. J.; ARIZAWA, S.; CURI, R.; LICHTIG, J. Protein measurement in several rat tissues by p-benzoquinone (PBQ) method. A comparative study with lowry's method. *Anal. Letters*, v. 25, p. 1225, 1992.

ZAIA, D. A. M.; BARRETO, W. J.; SANTOS, N. J.; ENDO, A. S. Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da análise de fatores do tipo q. *Anal. Chim. Acta*, v. 277, p. 1989, 1993.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova*. v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

CAPÍTULO XXIII

UMA REVISÃO SOBRE VETORES VACINAIS VIVOS NOTRATAMENTO DE DOENÇAS CAUSADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Thais Moreira Alexandre da Silva¹

Flaviana Alves dos Santos²

Filipe Colaço Mariz¹

Antonio Carlos de Freitas¹

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE),
Departamento de Genética, UFPE

²Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

E-mail de contato: antonio.freitas@pq.cnpq.br;
thais.moreira@hotmail.com

RESUMO – *O papilomavírus humano está intimamente associado ao desenvolvimento de diversos processos carcinogênicos, em particular o câncer cervical. A existência de vacinas profiláticas anti-HPV são de extrema importância para o combate à doença, contudo devido ao caráter tipo-específico das atuais vacinas sua eficácia com relação a tipos heterólogos do vírus é bastante limitada havendo uma*

susceptibilidade a infecções e lesões induzidas por outros tipos de HPV. Além disso, o alto custo de produção e a ausência de ação terapêutica reforça a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas vacinais profiláticas e terapêuticas com largo-espectro. Dessa maneira o presente trabalho teve como objetivo revisar os princípios do emprego de vetores vacinais vivos como estratégias para o controle de infecções e potencialidades como imunoterapia anticâncer contra as doenças causadas pelo HPV. O estudo foi realizado a partir de um levantamento bibliográfico de artigos científicos disponibilizados em diferentes bancos de dados. Com essa revisão, é possível concluir que os vetores vacinais vivos representam uma alternativa atrativa para a terapia anticâncer e ao desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares por dois principais motivos: elevada eficiência para apresentação de antígenos nas células imunes do hospedeiro desencadeando uma resposta imunológica humoral e celular potente sem a necessidade de utilização de substâncias adjuvantes e baixo custo de produção.

Palavras chave: Vacina; Vetor vacinal; Imunoterapia anticâncer.

1. INTRODUÇÃO

Vacinas são preparações antigênicas que possuem a capacidade de induzir uma resposta imunitária protetora específica no indivíduo contra um ou mais agentes infecciosos. Comumente são classificadas em 3 gerações, em virtude das estratégias que são utilizadas na preparação dos

antígenos vacinais. A primeira geração das vacinas corresponde aquelas que empregam o agente patogênico na sua composição, sejam na forma atenuada, através de tratamentos, ou inativados. Nesse grupo, como exemplos temos as vacinas contra varíola, sarampo e rubéola. A segunda geração surgiu com a possibilidade de identificação e produção em laboratório do antígeno imunodominante do microrganismo - o antígeno capaz de induzir uma maior produção de anticorpos protetores quando introduzido via vacinação. Como exemplo desse grupo, estão as vacinas contra tétano, hepatite B e HPV.

O papilomavírus humano (HPV) é a principal causa do desenvolvimento do câncer cervical, sendo a infecção por esse vírus a causadora de uma série de estágios pré-malignos denominados neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) que são lesões que antecedem o aparecimento do câncer *in situ*. Atualmente, vem sendo disponibilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) para meninas dos 9 aos 13 anos, a vacina anti-HPV que confere proteção contra 4 tipos de HPVs (-6, -11, -16 e -18), dos quais dois são HPVs de alto risco para o desenvolvimento do câncer cervical (-16 e -18). Contudo, são vacinas que possuem um elevado custo para sua produção e não apresentam ação terapêutica, isto é, contra infecções ou lesões já estabelecidas, havendo assim, a necessidade de novas alternativas vacinais.

Um novo conceito de vacinas denominadas de vetores vacinais vivos ou vacinas vivas está surgindo. São microrganismos atenuados ou não-patogênicos vivos que servem como carreadores do antígeno de interesse no organismo, sendo dessa maneira importantes para o

desenvolvimento de novas estratégias vacinais. A utilização dos vetores vacinais no tratamento e profilaxia das doenças causadas pelo HPV pode representar potencial alternativa frente às vacinas atualmente disponíveis para a prevenção da doença.

2. METODOLOGIA

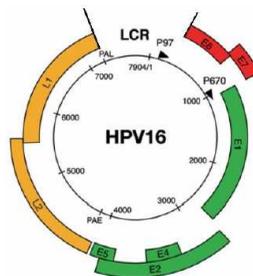
Foi realizado um levantamento de artigos científicos em diferentes bancos de dados bibliográficos existentes – PubMed, Scielo, Lilacs, Bireme e portal de periódicos da Capes/MEC. Os artigos selecionados envolveram artigos de revisões e artigos completos em português e inglês publicados até 2015 sobre o assunto. As palavras-chaves utilizadas foram vacinas, vacinas vivas, vetores vacinais vivos e HPV. A produção do trabalho de conclusão de curso ocorreu a partir da análise de uma lista de referências de publicações relevantes e artigos de revisão.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente, cerca de 210 Papilomavírus já foram caracterizados, dos quais mais de 150 infectam humanos (HPV) e cerca de 60 infectam outros mamíferos (BERNARD et al., 2010). Muitos dos HPVs identificados possuem um papel importante no desenvolvimento da carcinogênese anogenital, vaginal, peniano, orofaríngeo e, principalmente, cervical (CROSBIE et al., 2013).

Vírus da família Papillomaviridae, os PVs, são vírus pequenos, não envelopados que medem de 45-55 nm de diâmetro e apresentam um genoma DNA dupla-fita de aproximadamente 8 kb (CORTEGGIO et al., 2013). O genoma é composto por 8 sequências gênicas denominadas “open reading frames” (ORFs, quadro aberto de leitura) que são divididas em região de expressão precoce (E1-E7) e tardias (L1, L2) de acordo com a ordem temporal em que são expressas no ciclo do vírus (SILVA; STINGHEN, 2010). A região precoce é codificadora de proteínas associadas a replicação viral (E1, E2 e E4) e de proteínas envolvidas na transformação celular e evasão imunológica do vírus (E5, E6 e E7); a região de expressão tardia codifica as duas proteínas estruturais L1 e L2, as quais formam o capsídeo viral (figura 1) (DOORBAR, 2007).

Figura 1- Organização do genoma do HPV16, mostrando a disponibilidade dos genes no genoma viral. (Adaptado de Doorbar *et al.*, 2012).



As proteínas E1, E2 e E4 contribuem para a replicação viral do gene, a transcrição e, amplificação do genoma, respectivamente. As oncoproteínas E5, E6 e E7 interagem

com os receptores dos fatores de crescimento, ligando e inativando o gene supressor de tumores p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente (YUGAWA; KIYONO, 2009). As interações entre as proteínas de HPV e a célula hospedeira provocam a desregulação do controle do ciclo celular, levando ao desenvolvimento de câncer cervical (LIU et al., 2010).

Estudos epidemiológicos e funcionais estabeleceram a relação entre o câncer cervical e a infecção pelo HPV (ZUR HAUSEN, 2002), mostrando a detecção do vírus em mais de 90% dos carcinomas (MUÑOZ et al., 2003; ZIELINSKI et al., 2003). A infecção pelo HPV é a causa principal para o desenvolvimento de uma série de estágios pré-malignos, denominados neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) que são lesões precursoras para o câncer cervical (ALMONTE et al., 2008; RAJKUMAR et al., 2011). As NICs são classificadas em três estágios (I, II, III) podendo tender à regressão ou progressão dependendo do estágio em que está presente, sendo de extrema importância o diagnóstico precoce e exato (STEENBERGEN et al., 2005). Além disso, sabe-se que os HR-HPVs são uma condição necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer de colo de útero, havendo a necessidade da atuação de outros cofatores para a evolução da doença. (ALMONTE et al., 2008).

De acordo com o INCA (2015), no Brasil, o câncer cervical é o segundo tumor mais frequente entre as mulheres, correspondendo a quarta causa de morte feminina por câncer no país. Dados mostram uma estimativa da incidência global de 527.600 novos casos e 275.100 mortes em 2012, correspondendo ao terceiro tipo de tumor que mais causa

morte nos países em desenvolvimento (TORRE et al., 2015). Com isso, existe a necessidade de desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas e terapêuticas para o controle da doença.

As vacinas são capazes de induzir uma resistência imunológica a uma determinada doença, mas não necessariamente a uma infecção, as vacinas são preparações antigênicas que quando inoculadas em um indivíduo produzem uma resposta imunológica humoral (produção de anticorpos) ou a uma resposta mediada por células com o objetivo de combater agentes infecciosos (SAROJA, LAKSHMI, BHASKARAN, 2011). As vacinas são comumente classificadas em 3 grupos ou gerações, baseando-se nas estratégias utilizadas na preparação do princípio ativo, os antígenos vacinais (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As atuais vacinas anti-HPV são originadas de virus-like particles (VLPs) que são partículas morfologicamente capazes de mimetizar os vírions nativos e induzirem a produção de anticorpos neutralizantes pelo sistema imune (WAKABAYASHI et al, 2002; SLUPETZKY et al, 2007). São obtidas em sistemas de expressão recombinantes eucariotos e a partir da superexpressão da proteína L1, principal componente do capsídeo viral. Devido ao caráter tipo-específico das vacinas, a susceptibilidade a infecções e lesões induzidas por outros tipos de HPV ocorrem de maneira semelhante à de mulheres não vacinadas (DERCHAIN; SARIAN, 2007).

Apesar de representarem grande avanço no combate ao câncer cervical, as atuais vacinas anti-HPV possuem

significativas limitações relacionadas ao tempo de duração de eficácia da vacina, baixo espectro de ação e alto custo de produção (MA, RODEN; WU, 2010). As maiores preocupações com as vacinas profiláticas estão relacionadas ao seu alto custo de produção, necessidade de refrigeração e múltiplas doses dificultando a disponibilidade das vacinas em países em desenvolvimento que representam mais de 80% dos casos de câncer cervical no mundo (KLING; ZEICHNER, 2010; MA, RODEN; WU, 2010).

Diferente das vacinas preventivas anti-HPV que visam proteínas do capsídeo viral L1 e L2, as vacinas terapêuticas devem focar na utilização das oncoproteínas precoces E1-E7 do Papilomavírus humano. Além da necessidade de desenvolvimento de abordagens terapêuticas, as vacinas de segunda geração também visam aumentar o espectro de ação das estratégias vacinais antiHPV, a partir do desenvolvimento de abordagens multivalentes e de abordagens terapêuticas dirigidas contra as oncoproteínas E5, E6 e E7(MA et al., 2012).

As vacinas de subunidades peptídicas sintéticas são populares devido à estabilidade, pureza, facilidade de produção em larga escala em relação às vacinas de proteínas, segurança em comparação às vacinas baseadas em vetores vivos, ausência de efeitos secundários quando comparados com vacinas mortas ou atenuadas, além de poderem ser adaptadas para produzir os efeitos imunogênicos desejados. (SIMERSKA et al., 2014). Em geral, as vacinas de peptídeos possuem uma baixa imunogenicidade sendo necessária a utilização de substâncias adjuvantes a fim de aumentar o potencial imunogênico (SU et al., 2010).

As vacinas à base de proteínas surgiram como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas anti-HPV. Assim como as vacinas peptídicas, são mais seguras em comparação às vacinas de vetores vivos. A baixa imunogenicidade da vacina é uma grande desvantagem para seu desenvolvimento, de forma que estratégias devem ser empregadas para aumentar o potencial (LIN et al., 2010). Numerosas estratégias têm sido estudadas para aumentar a imunogenicidade e a resposta mediada por células das vacinas baseadas nas proteínas do HPV, através do uso de adjuvantes e moléculas imunoestimulatórias (SU et al., 2010).

As vacinas de DNA surgem como uma abordagem prática possuindo grande potencial de aplicação se tornando mais rentáveis que as vacinas de proteínas recombinantes e vetores virais (YANG et al., 2014). São candidatos vacinais bastante atrativos para a terapia contra o HPV devido ao baixo custo, simplicidade, alta estabilidade e segurança, tornando-as ideais para utilização em países em desenvolvimento, onde vacinas baratas são necessárias com grande urgência (MA et al., 2012).

Um novo conceito de vacinas denominadas de vetores vacinais vivos ou vacinas vivas está surgindo e, vem sendo considerado o padrão-ouro para a proteção contra patógenos intracelulares (ZAHEDIFARD et al., 2014), se mostrando fundamentais no desenvolvimento de novas estratégias vacinais. São caracterizados como micro-organismos atenuados ou não-patogênicos vivos, coletivamente desenvolvidos como carreadores de antígenos de interesse (BRETON et al., 2005).

Vacinas baseadas em vetores parasitários têm sido exploradas principalmente para controle de zoonoses. O emprego do protozoário parasita *Leishmania* sp. atenuada como candidato vacinal é extremamente interessante, uma vez que são capazes de mimetizar o curso natural de uma infecção quando inoculada e estimular uma resposta imune similar. Uma espécie não patogênica, a *Leishmaniarentolae* surgiu recentemente como uma alternativa para a geração de vacinas vivas contra os agentes patogênicos intracelulares, sendo de grande expectativa para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que não representam um risco de infecção e produz uma potente resposta imune em seres humanos (SALEHI et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

É possível concluir que os vetores vacinais vivos representam uma alternativa atrativa para a terapia anticâncer e ao desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares. A grande vantagem que apresentam frente às vacinas de segunda geração está relacionada com a capacidade de entrar com elevada eficiência nas células de interesse do organismo-hospedeiro desencadeando uma potente e eficiente resposta imunológica específica, tanto humoral quanto celular, além de poder acessar a maquinaria hospedeira e expressar proteínas próprias em sua conformação nativa sem necessidade de utilização de substâncias adjuvantes. Essas características dos vetores podem contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia vacinal que seja capaz de contornar as limitações das atuais vacinas.

5. REFERÊNCIAS

ALMONTE, M., ALBERO, G., MOLANO, M., CARCAMO, C., GARCÍA, P. J., PÉREZ, G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vac.*, v. 26, p. L16-36, 2008.

ANNUNZIATA, C., GENNARO, A., FRANCO, R., GIUSEPPE, O. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? *Inf. Age. Can.*, v. 8(1), p. 1, 2013.

BERNARD, H. U., BURK, R. D., CHEN, Z. VAN DOORSLAER K., ZUR HAUSEN, H., DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Vir.*, v. 401(1), p. 70-9, 2010.

BRETON, M., TREMBLAY, M. J., OUELLETTE, M., PAPADOPOULOU, B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Inf. Imm.* 2005

CID-ARREGUI, A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Ope. Vir. J.*, v. 3, p. 67-83, 2009.

DERCHAIN, S. F. M., SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. *Rev. Bras. Gin. Obs.* v. 29(6), p. 281-284 2007.

DINIZ, M. O., FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas Estudos Avançados, v. 24(70), p. 19-30, 2010.

DOORBAR, J., QUINT, W., BANKS, L., BRAVO, I. G., STOLER, M., BROKER, T. R., STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vac.*, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 2012.

J., MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Eng. Jor. Med.*, v. 348(6), p. 518-27, 2003.

KLING, M., ZEICHNER, J. A. The role of the human papillomavirus (HPV) vaccine in developing countries. *Int. Jor. Der.*, v. 49(4), p. 377-9, 2010.

LIN., K., DOOLAN., K., HUNG., C. F., WU, T. C. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *Jor. For. Med. Assoc.*, v. 109(1), p. 4-24, 2010.

LIU, T. Y., HUSSEIN, W. M., TOTH, I., SKWARCZYNSKI, M. Advances in peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccines. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 12(14), p. 1581-92, 2012.

MA. B., MARAJ, B., TRAN, N. P., KNOFF, J., CHEN, A., ALVAREZ, R. D., HUNG, C. F., WU, T. C. Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opi. Eme. Dru.*, v. 17(4), p. 469-92, 2012.

MA, B.; RODEN, R.; WU, T. C. Current status of human papillomavirus vaccines. *Jor. For. Med. Ass.*, v. 109(7), p. 481-3, 2010.

MUÑOZ, N., BOSCH, F. X., SANJOSÉ, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUÉ, X., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Eng. Jor. Med.*, v. 348(6), p. 518-27, 2003.

THANGARAJAN, R., KESAVAN, S., EELAKANTAN, V., SUNDERSINGH, S., MAYIL, V. B., GOPISETTY, G., GANESHARAJA, S. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Can.*, v. 11, p. 80, 2011

SALEHI, M., TAHERI, T., MOHIT, E., ZAHEDIFARD, F., SEYED, N., TASLIMI, Y., SATTARI, M., BOLHASSANI, A., RAFATI, S. Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. *Imm.*, v. 4(11), p. 1107-20, 2012.

SAROJA, C., LAKSHMI, P., BHASKARAN, S. Recent trends in vaccine delivery systems: A review. *Int. Jor. Phar. Inv.*, v. 1(2), p. 64-74, 2011.

SCHIFFMAN, M., CASTLE, P. E., JERONIMO, J., RODRIGUEZ, A. C., WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, v. 382(9895), p. 889-99, 2013

SILVA, T. G. T. L.; SANTOS, R.; STINGHEN, A. E. M. Biomarcadores em lesões do colo uterino. *RBAC* v. 42(3) p. 161-164, 2010.

SIMERSKA, P., ZIORA, Z. M., FAGAN, V., GOODWIN, D., EDROUS, F., TOTH, I. Design, synthesis and characterisation of mannosylated ovalbumin lipid core peptide self-adjuvanting vaccine delivery system. *Dru. Del. Tran. Res.*, v. 4(3), p. 246-55, 2014.

SLUPETZKY, K., GAMBHIRA, R., CULP, T., SHAFTI-KERAMAT, S., SCHELLENBACHER, C., CHRISTENSEN, N., RODEN, R. B.S., KIRNBAUERA, R.A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vac.*, v. 25(11), p. 2001-10, 2007

STEENBERGEN, R. D., WILDE, J., WILTING, S. M., BRINK, A. A., SNIJDERS, P. J., MEIJER, C. J. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *Jor. Clin. Vir.*, v. 32 Suppl 1, p. S25-33, 2005

SU, J. H., WU, A., SCOTNEY, E., MA, B., MONIE, A., HUNG, C. F., WU, T. C. Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential. *BioDrugs*, v. 24(2), p. 109-29, 2010.

TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J., JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Can. Jor. Clin.*, v. 65(2), p. 87-108, Mar 2015

WAKABAYASHI, M. T., SILVA, D. M., POTKUL, R. K., KAST, W. M. Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric viruslike particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. *Inter.*, v. 45(4-6), p. 300-7, 2002.

YANG, B., JEANG, J., YANG, A., WU, T. C., HUNG, C. F. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum. Vac. Imm.*, v. 10(11), p. 3153-64, 2014.

YUGAWA, T.; KIYONO, T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev. Med. Vir.*, v. 19(2), p. 97-113, 2009.

ZAHEDIFARD, F., GHOLAMI, E., TAHERI, T., TASLIMI, Y., DOUSTDARI, F., SEYED, N., TORKASHVAND, F., MENESES, C., PAPADOPOULOU, B., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J. G., RAFATI, S. ZAHEDIFARD, F. et al. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, v. 8(30), p. 2751, 2014.

ZIELINSKI, D., SNIJDERS, P. J. F., ROZENDAAL, L. DAALMEIJER, N. F., RISSE, E. K. J., VOORHORST, F. J., JIWA, N. M., LINDEN, H. C. VAN, SCHIPPER, F. A., RUNSINK, A. P., MEIJER, C. J. L. M. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in

situ and adenocarcinoma of the cervix. *Jor. Pat.*, v. 201(4), p. 535-43, 2003.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rer. Can.*, v. 2(5), p. 342-50, 2002.

CAPÍTULO XXIV

ESTUDO DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS: ALTERAÇÃO PÓS-REGISTRO

Waleska Pereira Viana¹

Tiago Rafael de Sousa Nunes²

José Lamartine Soares Sobrinho³

¹UniNovartis, Universidade Federal De Pernambuco, UFPE

²Nucleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

³Departamento de Farmácia, UFPE

E-mail de contato: waleska_viana@hotmail.com

RESUMO – *A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto. O objetivo dessa revisão é avaliar guias e normas para a realização de estudo de estabilidade na alteração pós registro, utilizando como metodologia a busca por artigos, resoluções e guias. No Brasil, a ANVISA é a responsável por aprovar e regulamentar a produção de biofármacos com regras rígidas e baseadas nas regulamentações da agência regulatória americana, o FDA (Food and Drug Administration) e da Europa, a EMEA (European Medicines Agency). Os produtos*

biológicos são definidos como produtos medicinais de origem biológica e podem ser substâncias ou microrganismos que ocorrem naturalmente ou originados de um organismo geneticamente modificado. A biotecnologia é baseada na biologia e utiliza os sistemas vivos e a manipulação genética destes sistemas e processos para desenvolver tecnologias e produtos. Os produtos biotecnológicos/biológicos devem ser caracterizados de forma bem definida para garantir a manutenção da sua conformação molecular e atividade biológica, já que em sua maioria apresentam como componentes ativos proteínas e/ou polipeptídeos. O reconhecimento internacional da importância do estudo de estabilidade abordando diferentes pontos existe desde a década de 80. O Brasil vem de fato adquirindo essa mesma exigência quando se consideram as resoluções sobre estabilidade da ANVISA. Portanto, observa-se o comprometimento da Agência Brasileira que, aos poucos, vem buscando a adequação de seus estudos de estabilidade com a realidade internacional de forma a padronizar a qualidade dos produtos, de forma a garantir a segurança das pessoas.

Palavras chave: Estabilidade. Produtos Biológicos. Registro. Pós-registro

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), a estabilidade farmacêutica é a capacidade que o produto tem de manter suas propriedades químicas, físicas,

microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (WHO, 1996).

A estabilidade de produtos farmacêuticos fundamenta-se na preocupação com a saúde pública, uma vez que a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos tóxicos de degradação. A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto, como propriedades físicoquímicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais da embalagem (BRASIL, 2005).

Dentre os fatores que alteram a estabilidade de fármacos, existem os intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros consistem em interações entre fármacos, interação entre fármaco e solvente ou excipientes, pH do meio, tamanho das partículas, qualidade da embalagem, condições nas quais o fármaco pode sofrer hidrólise, oxidação, fotólise. Em relação aos fatores extrínsecos, há as condições de estocagem e transporte, onde o fármaco pode sofrer alterações devido à temperatura, luminosidade, ar e umidade (AULTON, 2001).

No Brasil os medicamentos a serem registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) devem atender à regulamentação específica, Resolução RE nº 01/2005, que descreve os estudos que devem ser realizados para determinação do prazo de validade, o material de

embalagem e as condições de armazenamento e transporte de fármacos e medicamentos.

Este trabalho objetivou avaliar guias e normas para a realização de estudo de estabilidade na alteração pós registro, através do levantamento dos procedimentos necessários para se realizar esses estudos em produtos biológicos e de informações dentro das normas da ANVISA e em guias internacionais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada revisão da literatura abarcando o período de 2005 a 2014, com consultas em artigos científicos selecionados através de buscas no banco de dados Web of Knowledge a partir da fonte Web of Science, além de buscas em guias e normas regulamentares nacionais e internacionais e livros. A área de pesquisa foi Farmácia, e as palavras chave pesquisadas foram as seguintes: Estudo de estabilidade, alteração pós registro, produtos biológicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais

Os produtos biológicos são definidos como produtos medicinais de origem biológica e podem ser substâncias ou microrganismos que ocorrem naturalmente ou originados de um organismo geneticamente modificado. A categoria de produto biológico é mencionada na Lei nº 6.360/76, sendo

descrito como soros, vacinas, bacteriófagos, hormônios e vitaminas naturais ou sintéticas, fermentos entre outros. Seu uso abrange o tratamento de diabetes insulínodépendentes, reposição de hormônios sexuais e do crescimento, reposição enzimática, reposição de fatores de coagulação, tratamento de envenenamento por animais peçonhentos, prevenção de doenças pela vacinação, imunização passiva por meio de injeções parenterais de anticorpos, entre outros (BROWN, 2001; NOGUSHI, 2004; BREN, 2006).

O uso da biotecnologia tem um grande impacto no tratamento e no diagnóstico de doenças. Os medicamentos biológicos atualmente aprovados são utilizados no tratamento ou prevenção de condições, como Mal de Alzheimer, apnéia do sono, artrite reumatóide, ataques cardíacos, câncer de mama, diabetes, doença de Crohn, lepra, lúpus, entre outros. A efetividade da qualidade do produto biológico no mercado farmacêutico é regularmente avaliada mediante a realização de ensaios laboratoriais executados na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas) e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (ANVISA, 2002).

A qualidade está diretamente relacionada às características físicas e químicas do medicamento, enquanto a eficácia e segurança estão relacionadas com a dosagem terapêutica e a formação de produtos de degradação (CARVALHO et al., 2004).

O prazo de validade de fármacos e medicamentos baseia-se na cinética de reação, isto é, no estudo da velocidade de degradação e do modo como essa velocidade é

influenciada pela concentração dos reagentes, excipientes e outras substâncias químicas que possam estar presentes e por fatores como pressão, luz, umidade e temperatura (NUDELMAN, 1975; PRISTA et al., 1990). Os produtos biológicos são mais suscetíveis aos fatores ambientais, uma vez que são proteínas ou polipeptídios, o que dificulta a manutenção da sua conformação - e que influenciam diretamente na atividade biológica da molécula.

A estabilidade, mais especificamente, é um parâmetro essencial para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos ao longo do seu prazo de validade. O estudo de estabilidade é realizado desde o desenvolvimento do medicamento até possíveis confirmações do prazo de validade ou durante alguma alteração do produto após o registro do mesmo.

3.2 Resolução Brasileira

No Brasil, a ANVISA é a responsável por aprovar e regulamentar a produção de biofármacos com regras rígidas e baseadas nas regulamentações da agência regulatória americana, o FDA (Food and Drug Administration) e da Europa, a EMEA (European Medicines Agency).

As primeiras diretrizes para realização de estudos de estabilidade para registros de medicamentos foram estabelecidas em 2002 com a publicação da Resolução – RE n° 560, de 02 de abril de 2002, que introduziu o primeiro Guia para Realização do Estudo de Estabilidade. Depois, foram lançadas a Resolução – RE n° 398, de 12 de novembro de 2004, com o intuito de se adequar às diretrizes do ICH, e um terceiro guia publicado em 2005, a RE 01/05, ainda em

vigor – que atende as condições de armazenamento para condução dos estudos de estabilidade de longa duração às condições climáticas do país.

Para os produtos biológicos segue-se a RDC 55/2010 que fala do registro, a RDC 49/2011 que abrange o pós-registro. Estas se interligam à RDC 50/2011, que fala da estabilidade. Ainda pode-se citar a portaria 174/1996, específica para soros antivenenos, antitóxicos e antirrábicos, a RDC 323/2003 dos probióticos, a RDC 233/2005 que aborda os alergênicos e, por fim, a DC 46/2000, que apresenta os hemoderivados.

Observa-se que para o processo de pós-registro de produtos biológicos, os mesmos estudos de estabilidade tais como: estudo de acompanhamento, estudo de estabilidade acelerada, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de longa duração parcial são necessários; porém, segue-se a resolução de nº 50 publicada em 20 de setembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e outras providências, avanço bastante significativo que traz ao Brasil uma legislação específica para estabilidade dessa categoria de medicamento.

Diferente da RE nº1, a resolução para os produtos biológicos abrange não apenas as condições de temperatura e umidade que o produto terminado deve ser submetido, como também as condições de estabilidade do princípio ativo, produto intermediário e produto a granel. Essas etapas são de grande impacto para a segurança e qualidade do produto

acabado, uma vez que passam por etapas críticas de produção e/ou obtenção, sendo pouco estáveis na sua forma inacabada e que podem passar por longos períodos de armazenamento.

As condições de temperatura e umidade para realização do estudo de longa duração e estudo acelerado são especificadas na resolução para biológicos. Tratando-se de produtos de extrema facilidade de variação e diminuição de sua qualidade, é importante destacar que o conhecimento das diferentes zonas climáticas e a submissão do estudo de estabilidade acelerado e de longa duração dentro desse parâmetro que delimita o espaço ou zona geográfica faz com que os critérios de temperatura e umidade fiquem mais específicos, aumentando a confiabilidade no princípio ativo, produto intermediário e produto a granel.

Segundo Baja (2012), o mundo foi dividido em quatro zonas, e as condições para cada uma delas tem sido derivada com base na temperatura média anual e em dados de umidade de cada região. O Brasil apresenta uma diversidade climatológica conferida principalmente pela sua extensão territorial continental, vegetação, proximidade do mar, latitude, altitudes e linhas mestras do relevo (LEITE, 2005), pertencendo à zona climática IVb (quente/muito úmida); logo, seus testes de estabilidade acelerado e de longa duração deverão seguir a temperatura dessa zona climática.

Os produtos de degradação também fazem parte dos critérios de aceitação e são contemplados nessa legislação, deixando evidente a preocupação de alterações que podem vir a causar ineficácia e toxicidade antes do prazo estabelecido de validade do produto. Portanto, faz-se necessária a identificação dos produtos de degradação que podem se desenvolver ao longo do tempo, e sua quantificação é

realizada durante o estudo de estabilidade de longa duração. Além disso, as impurezas geradas durante o processo de obtenção da substância ativa devem ser qualificadas ou, se necessário, quantificadas para que não venham a causar risco à saúde dos indivíduos.

O estudo de foto estabilidade é citado no capítulo IV da RDC de nº50 de 2011, e segue o Guia de estudo de foto estabilidade publicado pela ANVISA, sendo recomendados testes em produtos expostos e produtos em sua embalagem primária.

Dos requisitos para alterações pós registro de produtos biológicos e produtos biológicos novos, são classificados três níveis de alteração: nível 1) alterações menores, sendo classificado como de baixa complexidade, que poderão ser implementadas sem prévia autorização da ANVISA; nível 2) alterações de média complexidade, necessitando de uma autorização prévia para implementação; e nível 3) alterações de alta complexidade, necessitando também de autorização prévia (BRASIL, 2011).

Todas as alterações realizadas devem ser feitas com análise de risco das funções dos constituintes alterados, sua interação com a embalagem primária e o princípio ativo, assim como o impacto de sua modificação para a qualidade do produto biológico terminado, baseando-se em metodologias analíticas adequadas.

Essas preocupações refletem diretamente a tentativa de ser seguir padrões de qualidade universais que trazem o Brasil a um patamar de desenvolvimento perante a seguridade de produtos biológicos e que refletem uma melhor qualidade e eficácia, uma vez que produtos de origem

biológica apresentam níveis de complexidade variáveis entre si.

3.3 Guias e Resoluções Internacionais

Os dados de estabilidade são produzidos para estabelecer as condições ideais de armazenamento e prazo de validade dos produtos. As informações contidas no estudo de estabilidade também podem justificar acréscimos de produtos que são adicionados para ajudar na estabilidade da formulação.

Na década de 90, Japão, EUA e União Europeia reuniram esforços para harmonização da legislação, com o intuito de padronizar os requisitos necessários para avaliar e garantir a qualidade do medicamento; assim, foi realizada a Conferência Internacional de Harmonização (ICH). Diante da necessidade de se realizar estudos de estabilidade, em 2004 a resolução RE nº 398 instituiu um novo guia, com a mesma finalidade dos guias de qualidade editados pelo ICH relativos a requerimentos técnicos para registro de medicamentos.

Na Europa, dois grupos de documentos fizeram parte dessa padronização entre União Europeia, Estados Unidos e Japão: EudraLex, que possui todos os documentos relativos ao Bom Fabrico de Medicamentos (GMP) e os guias ICH Q1A a Q1F.

Geralmente, as companhias farmacêuticas desenvolvem padrões e ensaios específicos para cada produto biológico; porém, esses processos devem garantir que todas as características dos produtos sejam mantidas sob condições de armazenamento que conservem seus perfis de segurança e

eficácia, cumprindo as estritas exigências de Boas Práticas de Manufatura (GMP) específicas para os produtos biológicos que incluem: Produção do princípio ativo por biotecnologia, isolamento e purificação do princípio ativo, desenvolvimento e validação do processo de elaboração com consistência em todas as suas etapas, análise do produto final e comprovação da eficácia e segurança do medicamento através da realização de ensaios clínicos.

Assim como a Resolução Brasileira nº55/2010 deve ser completa com a descrição detalhada do processo produtivo demonstrando todas as evidências de segurança e eficácia clínica, o ICH também aborda em seu guia a importância e exigências desses estudos para o registro sanitário durante o desenvolvimento de medicamentos.

Os produtos biotecnológicos/biológicos devem ser caracterizados de forma bem definida para garantir a manutenção da sua conformação molecular e atividade biológica, já que em sua maioria, apresentam como componentes ativos as proteínas e/ou polipeptídeos. A fim de evitar a degradação, as condições de armazenamento devem ser rigorosas. Portanto, o ICH Q5C que se aplica, em geral, aos produtos biológicos, traz todas as condições necessárias para se realizar os estudos de estabilidade desses produtos tão sensíveis a variações ambientais. Quando se trata de estabilidade, o ICH Q5C expõe as condições de armazenamento, o número de lotes mínimos necessários para representar a amostra tanto para o princípio ativo, como produto intermediário e produto final.

O crescimento significativo do uso de proteínas terapêuticas dentro da indústria farmacêutica tem salientado questões como a sua estabilidade durante o período de estocagem e a liberação eficaz de forma a evitar a ocorrência de efeitos adversos. Por isso, a mencionada resolução brasileira nº50/2011 mostra que o Brasil vem seguindo um perfil de exigências semelhante aos padrões internacionais.

O FDA apresenta as orientações das documentações necessárias no Estudo de Estabilidade de Medicamentos Humanos e Biológicos (02/87). Diferentes níveis de alteração pós-registro são considerados e detalhados para evitar que algum impacto durante a nova formulação venha a afetar a qualidade e desempenho do produto; essa preocupação é recorrente e a ANVISA também expõe esse ponto em sua Resolução.

Outro fator interferente são as zonas climáticas que há pouco não eram consideradas, até que se observou a importância de sua proposição - já que o produto é comercializado ou destinado a diferentes países. Desta forma, o mundo foi subdividido em zonas climáticas com diferentes especificações de temperatura e umidade. Apesar da preocupação que inclui a legislação brasileira, em um mesmo país como o Brasil pode-se encontrar uma grande variação climática que pode levar a um problema ainda não solucionado.

A notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos também são evidenciadas pela ANVISA. A toxicidade desses compostos pode comprometer a saúde do paciente, levando a complicações;

portanto, o isolamento e identificação são exigidos pelas agências regulamentadoras, de acordo com a EMEA, 2006: “Quando comprovado cientificamente que o produto de degradação na concentração encontrada não apresenta toxicidade, o medicamento está aprovado no estudo de estabilidade.”

Todo princípio ativo empregado na preparação de medicamentos apresenta uma certa facilidade em absorver energia, ocasionando a formação de produtos de degradação por fotólise (MORIWAKI *et al.*, 2001). Desta forma, é importante dentro do estudo de estabilidade a avaliação da foto estabilidade e esse assunto é palco da abordagem tanto das normas brasileiras como internacionais. Desde 1996, o FDA emite orientações no ICH recomendando a realização desse tipo de análise.

O estudo de estabilidade acelerado e de estresse são ferramentas utilizadas internacionalmente, que asseguram uma melhor comparação do produto durante essa fase de mudança; as condições estabelecidas estão descritas conforme o ICH Q5C e Q1A(R)(ICH Q5E, 2005).

O estudo de estabilidade é chave importante no desenvolvimento, registro e pós-registro dos produtos biológicos, devido à sua alta suscetibilidade a mudanças. Essas alterações são reconhecidas e, de fato, agregam um aprofundamento no conhecimento e possíveis alterações nas características e, conseqüentemente, na qualidade do produto.

4. CONCLUSÃO

O Brasil vem aos poucos atendendo o padrão de exigência internacional quando se observam as resoluções sobre estabilidade da ANVISA. Ao longo do tempo, os requisitos regulamentares têm sido cada vez mais rigorosos com o intuito de se enquadrar às condições úteis e aumentar confiabilidade. Portanto, os testes de estabilidade devem ser realizados de forma a atingir os pontos críticos, evitando o comprometimento do produto e garantido a segurança das pessoas.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA. Guia para Realização do Exercício de Comparabilidade para Registro de Produtos Biológicos, 2011. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/>

ANVISA, 2002. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=36&userassunto=143>> acesso em 13 de janeiro de 2015

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª ed. São Paulo: Artmed, 2001.

BRASIL. Lei n/ 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Brasília: Diário Oficial da União, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria do Colegiado – Resolução nº 50, de 20 de setembro de 2011. Brasília: Diário Oficial da União, 2011.

BREN, L. The road to the biotech revolution: Highlights of 100 years of biologics regulation. *FDA Consumer articles*, v. 40, n. 1, p. 50-57, 2006.

BROWN, Stephen. Achieving compliance for biologics. *Trends in Biotechnology*, v.19, n. 8, p.281-282, 2001.

CARVALHO, J. P. et al. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. *Fármacos&Medicamentos*. Nº 8, 22-27, 2004.

EMA. ICH Topic Q3B (R2), “Impurities in New Drug Products”. ICH – International Conference on Harmonization: Londres, 2006.

GAMA, M. P.; ANDREOLI, S. C. S. Registro de Produtos Biológicos. In: VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F. REDRIGUERI, C. F. A Regulação de Medicamentos no Brasil. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 71-72, 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Guidance for industry Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in their Manufacturing Process stability testing of new drug substances and products. Nov, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON
HARMONISATION (ICH). Guidance for industry Q5C
Stability Testing of Biotechnological/Biological
Products. Nov, 1995.

MORIWAKI, C. et al. Estudo da degradação do fármaco
Nabumetona por fotólise direta. *Acta Sci.*, v. 23, n. 3,
651-654, 2001.

NOGUSHI, P. Keynote Address. Karger Basel, Bethesda,
v. 116, p. 21-25, 2004.

WHO. International Stability Testing: guidelines for
stability testing of pharmaceutical products containing
well established drug substances in conventional
dosageforms. Annex 5, WHO Technical Report Series.
863, 1996.

CAPÍTULO XXV

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Wagner Luis Mendes de Oliveira¹

Bruno Severo Gomes²

¹UniNovartis, Universidade Federal De Pernambuco, UFPE

²Laboratório de Taxonomia e Sistemáticas de Fungos, UFPE

E-mail para contato: bio.wagner@gmail.com

RESUMO - *Na indústria farmacêutica denominamos contaminação a introdução não desejada de impurezas de natureza química ou microbiológica seja na matéria prima, produto intermediário e/ou produto terminado durante as etapas de amostragem, produção, embalagem, reembalagem, armazenamento ou transporte. Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonasaeruginosa, Salmonellaspp., além de fungos do gênero Aspergillus, são considerados indicadores de contaminação na indústria farmacêutica. A presença de contaminantes microbianos compromete a estabilidade do produto, resultando em alterações físico-químicas, que se manifestam pela mudança de cor ou aparecimento de odor desagradável podendo trazer algum prejuízo para o consumidor. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) partem do princípio que os produtos são manipulados visando qualidade apropriada para o uso ao qual*

são destinados e essa qualidade é alcançada, prevenindo a ocorrência de erros na fonte da contaminação. O presente estudo descreve os principais agentes responsáveis pela contaminação microbiológica na indústria farmacêutica, as principais fontes de contaminação no processo de produção, as condutas padronizadas pelas Boas Práticas de Fabricação e as estratégias de controle ambiental com base nas normas e resoluções vigentes. Ainda expõem alguns conceitos importantes dentro do controle de qualidade na produção de medicamentos e avalia os riscos das contaminações e medidas corretivas e preventivas que garantam a qualidade do produto final.

Palavra chave : Contaminação industrial, Bactérias, BPF

1. INTRODUÇÃO

Os produtos farmacêuticos estão sujeitos à contaminação por microrganismos, tais como bactérias, fungos e leveduras, durante o processo de fabricação. A contaminação pode ter origem na matéria-prima utilizada ou ser introduzida durante o processo produtivo.

A presença de contaminantes microbianos pode facilmente comprometer a estabilidade do produto, resultando em alterações que, embora possam não afetar o teor do princípio ativo, podem se manifestar por modificações de propriedades químicas (oxidação, pH, reatividade), físicas (eletromagnéticas, ópticas, mecânicas, fluidodinâmicas) e propriedades farmacopeias. Além de constituir risco para a saúde do consumidor, principalmente quando se trata de microrganismos patogênicos (SOUZA; OHARA; SAITO, 1994).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 em 16 de abril de 2010, estabelece parâmetros para o controle

microbiológico, bem como aprimora as ações de controle de produtos sujeitos a vigilância sanitária e ações de proteção ao consumidor (BRASIL, 2010). Estas normas buscam avaliar desde o controle do ar que circula na área limpa, utensílios e materiais que interagem com a fabricação do medicamento até os operadores que participam de todo o processo (XAVIER et al., 2013).

O presente estudo tem o objetivo de descrever as principais fontes de contaminação microbiana na indústria farmacêutica, avaliar seus riscos e discutir como as normas regulamentadoras podem estabelecer medidas que garantam a qualidade dos medicamentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho desenvolvido teve caráter exploratório, através de uma pesquisa bibliográfica em livros, artigos científicos, teses e dissertações. Foram utilizados os bancos de dados PubMed, Scielo e ScienceDirect, utilizando como palavras-chave: contaminação farmacêutica, Boas Práticas de Fabricação, RDC ANVISA e seus respectivos sinônimos em língua inglesa. Foi realizada uma leitura de todos os resumos do material selecionado de forma rápida e objetiva para a seleção dos textos que mereceram uma leitura mais atenta e profunda. Após esta exploração, foi realizada uma avaliação crítica dos textos selecionados e estes foram organizados por ordem cronológica para permitir uma análise comparativa da evolução temporal sobre o tema.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Contaminação microbiológica de produtos farmacêuticos

Segundo a RDC nº 17 de 16 de abril de 2010, contaminação é a introdução não desejada de impurezas de natureza química ou microbiológica, ou de matéria estranha, em matéria prima, produto intermediário e/ou produto terminado durante as etapas de amostragem, produção, embalagem ou reembalagem, armazenamento ou transporte (BRASIL, 2010).

Segundo a definição dada no item 3.4 da NBR/ISO 14644 de 2005, contaminante é qualquer diminuta porção de matéria com limites físicos definidos, que possa afetar adversamente o produto ou processo. Essas partículas podem ser de diversos tamanhos e em geral detectáveis por inspeção visual ou invisíveis. Especialmente as partículas de tamanho invisíveis demandam testes analíticos específicos para a sua detecção (ISO, 2005; USP, 2009).

Muitos casos de contaminação microbiana em medicamentos já foram descritos. A contaminação pode ser proveniente de falhas do próprio pessoal de operação; da matéria prima; dos materiais de acondicionamento da matéria prima e de embalagens primárias para os produtos em processo; da água, troca de ar entre ambientes internos, do ar comprimido ou gases utilizados nos processos; dos equipamentos e utensílios de produção; agentes utilizados para a limpeza e sanitização das superfícies críticas e através da retenção de sujidades por um tempo suficiente para a proliferação microbiana local (AMARAL, 2011).

3.2 Boas Práticas de Fabricação (BPF)

Segundo a RDC nº 17 no seu capítulo II artigo 13 conceitua BFP como parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro

As boas práticas são de aplicação obrigatória, determinada por resoluções específicas que descrevem os níveis de responsabilidade. Cabe ao governo estabelecer resoluções enormes, objetivas e claras quanto as especificações do produto, avaliação, registros e inspeção, avaliação de matérias primas e estabelecimento industrial. Quanto ao fabricante, cabe garantir a qualidade do produto desde seu desenvolvimento até a utilização, assegurando princípios como eficácia, segurança, estabilidade e custo razoável.

As BPFs devem ser aplicáveis a todas as operações envolvidas na fabricação de medicamentos, incluindo aqueles medicamentos em desenvolvimento destinados a ensaios clínicos. As BPFs são passíveis de atualização contínua, de forma a acompanhar a evolução de novas tecnologias.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segue recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre Certificação de Qualidade de Produtos Farmacêuticos. A RDC nº 17 padroniza as ações e foi atualizado com base no Anexo quatro do 37º Relatório da Organização Mundial de Saúde de 2003 TRS Nº. 908. A RDC nº 17 revoga a Portaria nº 500 de 09 de outubro de 1997 e a RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003. A RDC nº 17 versa sobre a atualização do Regulamento Técnico para as Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos e, por isso, é um dos mais importantes documentos para o setor de controle de contaminação em ambientes internos, já que a indústria

farmacêutica é a maior usuária de produtos e serviços de áreas limpas no Brasil.

As BPFs determinam muitos procedimentos que estão relacionados à prevenção da contaminação microbiológica na produção, tais como:

Princípios de zoneamento: Restrição da área de manipulação a funcionários treinados e adequadamente paramentados, de acordo com o grau de limpeza exigido em cada setor (PINTO, 2003).

Vestimenta: Os funcionários que entrem na área de produção devem estar devidamente paramentados. A escolha de material para as vestimentas deve considerar a não liberação de fibras, que se tornariam fontes de contaminação indesejável, além da resistência à esterilização e conforto ao operador. Também devem ser utilizados capuz, sapatos/botas e luvas, complementares à vestimenta. (PINTO, 2003).

Treinamento: As operações realizadas nas salas limpas devem ser conduzidas por funcionários treinados não apenas para a produção, mas também para o comportamento dentro das áreas. Os treinamentos devem mostrar aos funcionários a importância de se seguir os procedimentos adotados e podem gerar certo impacto levando a uma conscientização das necessidades de se adotar um comportamento diferenciado. Os programas devem ser documentados, com controle de frequência e níveis de aproveitamento observados. Toda a estrutura gerencial da planta deve estar comprometida com o treinamento, não apenas os funcionários envolvidos diretamente com o processo de manipulação (PINTO, 2003).

Motivação: Funcionários desmotivados tendem a não se comprometer com suas funções, logo a motivação deve ser cultivada entre os funcionários (PINTO, 2003).

Procedimentos: Os procedimentos operacionais devem ser documentados, de forma que permitam que todas as atividades sejam feitas de maneira reprodutível, devendo ser escritos seguindo etapas, em linguagem fácil e no imperativo. Os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) como são chamados, devem conter frequência de execução quando for o caso, e definir responsabilidades (PINTO, 2003).

Planejamento da área de produção: Tudo deve ser projetado e planejado para não oferecer riscos de acúmulo ou proliferação de partículas (pisos, paredes, móveis e equipamentos, por exemplo). Os rodapés e cantos de parede deve ser arredondado para não acumular partículas, o piso deve ter alta resistência e ao mesmo tempo permitir total assepsia. O grau de limpeza na manipulação vai depender de qual categoria se encaixa o produto, no caso de produtos farmacêuticos estéreis a produção deve ser feita em áreas limpas, que deverão ser mantidas dentro de padrões de limpeza apropriados e sistemas de filtração de ar tipo Ar Particulado de Alta Eficiência (HEPA) (PINTO, 2003).

3.5 Estratégias de controle microbiológico

A estratégia inicial para a prevenção da contaminação microbiana em áreas críticas deve seguir inicialmente uma linha racional de investigação denominada Análise de Perigos e Ponto Críticos de Controle (APPCC) para a determinação dos principais vetores de conta (AMARAL, 2011).

O monitoramento do ar pode ser realizado por amostragem passiva, ou seja, por meio da exposição das placas com meio de cultura ao ar durante um tempo determinado, ou amostragem ativa pela passagem de um determinado volume de ar por placas contendo meio de cultura apropriado (USP 30, 2012).

Para o monitoramento de superfícies são empregadas as placas Rodacou ainda a utilização de *swabs* para a amostragem de superfícies irregulares. São avaliados pisos, paredes, superfícies de equipamentos, preferencialmente próximo às áreas de maior exposição do produto, consideradas as áreas mais críticas e áreas adjacentes (USP 30, 2012).

A partir deste estudo é possível definir as medidas corretivas, caso se façam necessárias, e em paralelo elaborar um programa preventivo que inclua a qualificação de fornecedores de insumos e serviços, indique as tendências de contaminação em pontos próximos dos limites máximos permitidos, a capacitação dos operadores que contemplem técnicas de higiene e o cumprimento das normas de BPFs vigentes e desencadeie uma ação preventiva antes que algo afaste-se dos limites de controle (AMARAL, 2007).

4. CONCLUSÃO

A contaminação é geralmente oriunda de uma fonte ambiental e que a adoção de medidas corretivas e preventivas podem bloquear esse fluxo. As principais espécies responsáveis pela contaminação na indústria farmacêutica, estão geralmente associadas a microbiota humana ou a uma microbiota transitória fruto de hábitos de higiene.

A adoção das normas de BPFs vigentes atualmente no País permite um processo produtivo seguro, com alto grau de confiança, atendendo as exigências internacionais, resultando em um produto em concordância com suas especificações e qualidade característica.

O estudo também mostra a necessidade da implementação de um rígido e diário monitoramento de toda a cadeia produtiva e inclua a qualificação de fornecedores e

insumos, além da capacitação dos operadores para o cumprimento das normas de BPFs vigentes.

4. REFERÊNCIAS

AMARAL, F. D. Validação de limpeza. Controle de Contaminação. Editora Nova Técnica. Ano 9, No. 96, 27-29. São Paulo, 2007.

AMARAL, F. D. Monitoramento Microbiológico em Ambientes Críticos como Ferramenta de Controle de Qualidade. *Fármacos & Medicamentos*. v.67, 14-20. São Paulo, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Boas Práticas para a Fabricação e Controle de Produtos Farmacêuticos. Brasília: ANVISA, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle Biológico da Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 53– 95.

SOUZA, M.R.; OHARA, M.T.; SAITO, Takako. Contaminação Microbiana em Emulsões Cosméticas para Aplicação Dérmica. *Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica*. 30(1): 23-28, 1994.

THE United States Pharmacopeia. 35 ed. Rockville: Mack Printing, 2012.

XAVIER, M. P., A. A. R. M. VIEIRA, A. S. S. SILVA,
M. A. S. XAVIER, A. R. E. O. XAVIER. Importância
Do Monitoramento Ambiental Em Áreas Classificadas.
BIOFAR, v. 09, nº 04, 2013.

CAPÍTULO XXVI

CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA PRODUÇÃO DE BIOFÁRMACOS: CONTAMINANTES E PURIFICAÇÃO

Renata Juliana Marques Cavalcanti¹

Tiago Rafael de Sousa Nunes²

César Augusto Souza de Andrade³

Cristina Maria de Souza Motta⁴

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Departamento de Bioquímica, UFPE

⁴Departamento de Micologia, UFPE

E-mail de contato:renatajcavalcanti@hotmail.com

RESUMO – *O controle de qualidade da água para a indústria biofarmacêutica é fundamental para garantir a qualidade dos biofármacos. Este trabalho é uma revisão de literatura com o objetivo de analisar a presença de contaminantes e indicadores microbiológicos, métodos de desinfecção na produção e controle de qualidade da água na indústria biofarmacêutica nas diferentes etapas de*

purificação para a produção de biofármacos. Os principais tipos de águas purificadas utilizadas nessa indústria são água para injetáveis, água purificada e água ultrapurificada. Todas devem possuir um alto nível de pureza, para não comprometer dados de análises, ocorrer interferências na produção e atividade do medicamento, sendo a pureza da água para injetável mais alta, tendo em vista que por participar de formulações de uso parenteral a presença de qualquer contaminante microbiológico ou químico irá comprometer a qualidade do medicamento e poderá colocar a saúde dos usuários deste medicamento em risco. Existem diversos tipos de purificadores que podem ser utilizados, porém, o que apresenta melhores características de desempenho é a osmose reversa. O controle de qualidade da água é indispensável para manter os padrões exigidos pelos órgãos reguladores e sua realização deve ser em pontos críticos e específicos, indicados através das análises que serão norteadas pelas ações da validação.

Palavras chave: Qualidade da água, Indústria biofarmacêutica; Purificação

1. INTRODUÇÃO

Na indústria biofarmacêutica a água utilizada pode ser purificada através de vários métodos como destilação, osmose reversa, radiação UV, deionização, troca iônica. Em adição, os tipos de água tratada utilizados são a água purificada, água ultra purificada e água para injetáveis.

Mesmo sendo métodos seguros e indicados pelas farmacopeias para a produção de fármacos e injetáveis, a qualidade destes dependerá da qualidade da água disponível, que é distribuída pelas companhias de abastecimento público que será utilizada pela indústria para eventual purificação. Esta água poderá apresentar diversos interferentes e sua qualidade pode ser menor ou mais elevada, podemos citar das principais mudanças a variação de pH e cloro residual, estas características físico-químicas interferem diretamente nas características dos produtos que utilizarão desta água e os níveis de cloro residual podem danificar inclusive os aparelhos de purificação. A água purificada é a que apresentará baixo nível de compostos orgânicos e inorgânicos. A presença de compostos inorgânicos favorece ou indica a possível contaminação microbiológica.

Para as análises de controle de qualidade em água para uso farmacêutico indica-se a contagem de micro-organismos viáveis totais, analisando patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a presença de leveduras. A presença de qualquer um destes micro-organismos tanto na água quanto no sistema de purificação comprometerá a qualidade desta água, impossibilitando seu uso na produção.

Esses micro-organismos podem causar na saúde humana diversos tipos de doenças infecciosas. *Escherichia coli* causa uma grande diversidade de infecções, principalmente intestinais, mas também infecções urinárias e meningite. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria oportunista das condições imunológicas do paciente, está relacionada à grande parte das infecções hospitalares,

adquirida pelo paciente por invasão ou quebrando a barreira subcutânea através da aplicação de injeções. *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria resistente a vários tipos de antibióticos, é responsável por infecções do aparelho respiratório como pneumonia, podendo também causar infecções intestinais, hospitalares e do aparelho urinário.

Para controlar a qualidade da água é necessário avaliar o nível da qualidade de água disponível, considerando seus contaminantes iniciais, o processo a ser realizado e as possíveis formas de tratamento para que seja atingida a qualidade desejada. Neste contexto nota-se a necessidade de um plano de controle de qualidade, que indicará os pontos críticos de recontaminação, a periodicidade de coletas a serem realizadas, processos de limpeza nos sistemas de purificação, tornando-se crucial o procedimento de validação dos processos e qualificação dos aparelhos.

Assim, reitera-se a importância de avaliação minuciosa dos contaminantes que podem comprometer a qualidade desta água, pois sugere-se que nem sempre os sistemas estão em adequação às normas descritas, e existe uma confiabilidade na segurança dos processos de purificação de água o qual pode não ser segura.

Objetivou-se levantar os contaminantes, indicadores microbiológicos e métodos de desinfecção na produção e controle de qualidade da água na indústria farmacêutica nas diferentes etapas de purificação para a produção de biofármacos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada revisão da literatura através da pesquisa bibliográfica com observação de publicações com base em artigos científicos, periódicos, teses, dissertações, livros, farmacopéia, portarias e normas reguladoras vigentes, relacionadas com a qualidade da água na indústria farmacêutica, métodos de purificação e sobre características e patogenicidade de micro-organismos de veiculação hídrica.

Foram utilizadas portarias vigentes, teses e dissertações publicadas, revistas científicas, farmacopéia brasileira, resolução de diretoria colegiada, guia de qualidade da ANVISA, livro de microbiologia e de métodos analíticos da água. Como ferramentas de busca para as pesquisas de periódicos, artigos científicos, teses e dissertações foram consultadas as bases de dados Scielo, Medline e Google Acadêmico, apresentando temas que estivessem ligados ao tema principal desta monografia foi realizada uma leitura mais detalhada de cada onde através desta pode-se selecionar os que apresentaram uma linguagem mais clara e objetiva.

Para a área microbiológica foram utilizados arquivos dos anos de 2003, 2004, 2005, 2006 e 2008, porém mais concisos na explanação do assunto. Alguns dos termos mais utilizados para a realização da pesquisa foram: água na indústria farmacêutica, controle de qualidade da água, microbiologia da água, micro-organismos de veiculação hídrica, contaminação, sistemas de tratamento de água, purificação da água.

Foram descartadas dissertações, teses e artigos científicos que foram realizados baseados em legislações que não se encontram mais vigentes ou que utilizavam dados edição anterior da farmacopéia, portarias, guias de qualidade e legislações que foram revogadas também não foram utilizadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A água na indústria pode se apresentar de diversas formas, mas é basicamente dividida em: água para injetáveis – API, água purificada – AP e água ultrapurificada – AUP. As demais encontradas em outras farmacopéias seguem o mesmo padrão de pureza destas.

Devido ao rigoroso controle microbiológico da água de uso na indústria farmacêutica, a presença de micro-organismos geralmente provém da microbiota da própria fonte de água ou, às vezes, de contaminação dos aparelhos de purificação. O art. 548 da Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 dispõe das boas práticas de fabricação de medicamentos na Seção II sobre a Produção de Água Potável, afirmando que: “Devem ser adotados mecanismos de controle microbiológico e sanitização para os sistemas de água purificada mantidos em temperatura ambiente, pois esses são particularmente suscetíveis à contaminação microbiológica, principalmente quando os equipamentos ficarem estáticos durante períodos de pouca ou nenhuma demanda de água.” (BRASIL, 2010a.)

O capítulo VI da Portaria MS nº 2914 dispõe das exigências aplicáveis aos sistemas e soluções alternativas de abastecimento de água e das indicações para atingir os padrões microbiológicos: “Toda água para consumo humano, fornecida coletivamente, deverá passar por processo de desinfecção ou cloração.”

Para que as determinações deste capítulo sejam efetivamente realizadas, é fundamental o uso de cloro ou seus derivados para a desinfecção. Entretanto, apesar de matarem os micro-organismos patogênicos, também geram subprodutos que normalmente são prejudiciais à saúde (RODRÍGUEZ et al.,2007).

Estes subprodutos podem interferir na qualidade da água que irá ser utilizada na indústria farmacêutica, indicando assim a necessidade de um monitoramento mais aprofundado da qualidade desta quanto da sua entrada na indústria. Existem outros produtos que podem ser usados para a desinfecção da água, como o ozônio, o dióxido de cloro, a cloramina e o ácido paracético. A Portaria MS Nº 2914 de 2011 deixa em aberto o uso de outros produtos que possam destruir os micro-organismos, contanto que eles estabeleçam a mesma segurança contra micro-organismos patogênicos.

Os contaminantes da água podem ser divididos em inorgânicos e orgânicos. Os materiais inorgânicos contaminantes caracterizam-se por serem sólidos e gases encontrados dissolvidos na água, podem ser sílicas, magnésio, nitratos, fosfatos, cálcio, ferro e carbono (BREDA, 2001). Esses elementos têm relação com a alcalinidade e dureza da água, alterando-as. Como a maioria desses

elementos são ânions e cátions, ou seja, apresentam carga negativa ou positiva, respectivamente, os testes de condutividade elétrica são empregados para identificar a presença destes tipos de materiais inorgânicos, bem como a sua concentração.

Em relação aos orgânicos, encontram-se os derivados de petróleo, produtos utilizados na agricultura que contaminam mananciais e lençóis freáticos (como adubos e herbicidas), bem como tecidos vegetais e animais. A quantidade de matéria orgânica indica provável presença de decompositores, o que acarretará no maior consumo de oxigênio por estes, indicando assim a necessidade dos testes de Oxigênio Dissolvido como um dos indicadores desta qualidade. O teste de carbono orgânico total também é amplamente utilizado na indústria, com a finalidade de analisar os níveis e presença destes contaminantes.

Em relação aos contaminantes microbiológicos da água na indústria farmacêutica a Farmacopéia Brasileira relata que: “os contaminantes mais frequentes são bastonetes gram-negativos, principalmente dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* e *Acinetobacter*. ” (BRASIL, 2010b).

Além desses, as partes de células bacterianas, conhecidas como pirogênios, também se tornam um componente microbiológico contaminante de interesse a ser analisado, pois sua presença causa aumento de temperatura e febre em animais. Como a indústria farmacêutica trabalha com produtos de uso humano e animal e estes sintomas

causam desconforto, seria necessário indicá-los como reação adversa, o que não estaria intimamente ligada ao produto em questão - e sim, a uma desconformidade na qualidade da água.

Os coliformes totais são um dos indicadores mais utilizados nas análises laboratoriais que visam observar a contaminação da água (SILVA et al., 2001). Os principais pertencentes a este grupo são da família Enterobacteriaceae, porém existe uma enorme diversidade de gêneros e espécies. Dos principais gêneros encontram-se *Salmonella*, *Shigela*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, entre outros. Destes, o mais estudado é o *Escherichia*. Também pertencem a este grupo bactérias não originárias de trato intestinal de animais de sangue quente, como é o caso de *Aeromonas* e *Serratia*. Todos são apresentados pela Farmacopéia como frequentes na água da indústria farmacêutica com potencial patogênico, sendo, portanto, um fator de risco - caso não sejam eliminados durante a purificação.

Para remover os contaminantes da água, tanto microbiológicos quanto químicos, são utilizados diversos meios de purificação, como: osmose reversa, destilação, deionização e eletrodeionização, microfiltração, radiação UV, absorção orgânica, entre outros, de acordo com a qualidade da água recebida e a qualidade desejada pra a finalidade a ser usada. A Farmacopéia, bem como monografias e resoluções, define a finalidade de cada meio de purificação, como atuam e as implicações que podem ocorrer do uso de cada um. A tabela 1 discrimina os principais métodos, comparando suas vantagens e desvantagens.

O método de osmose reversa é amplamente utilizado para produção das águas para injetáveis e águas purificadas. É necessária a utilização de um pré-tratamento para impedir depósitos de material e depósitos biológicos nas membranas do aparelho osmótico.

Oristanio, Peig e Lopes (2006) discorrem sobre os problemas decorrentes quando ocorre o depósito em membranas:

“Este acúmulo leva à deterioração física e química das membranas pela abrasão e oxidação das camadas poliméricas e o aumento das pressões em virtude da maior resistência da água em atravessar a membrana.”

Por este motivo, a qualidade físico-química da água de alimentação deste aparelho deve ser controlada para evitar sua danificação e mantê-lo em bom desempenho de funcionamento, uma vez que as membranas danificadas não conseguem manter os altos níveis de purificação da água. Ainda de acordo com os autores, o acúmulo de material biológico nas membranas faz com que os micro-organismos se proliferem, podendo formar biofilmes – o que, além de danificar o sistema, contamina a água que deveria sair tratada.

Tabela 1 - Métodos de purificação da água, suas vantagens e desvantagens.

Método	Vantagens	Desvantagens
Osmose reversa	Apresenta uma ótima eliminação de bactérias, pirogênicos e partículas em suspensão, boa eliminação de contaminantes dissolvidos orgânicos e ionizados.	Eliminação insuficiente de gases ionizados. Necessário pré-tratamento para impedir depósitos biológicos, propenso a formação de biofilmes.
Destilação	Apresenta uma ótima eliminação de bactérias, pirogênicos e partículas em suspensão. Boa eliminação de contaminantes dissolvidos orgânicos e ionizados.	Apresenta eliminação baixa ou insuficiente gases ionizados, possível carreamento de compostos voláteis.
Deionização	Ótima eliminação de contaminantes dissolvidos ionizados	Apresenta eliminação insuficiente para bactérias. Não elimina pirogênicos e partículas em suspensão.
Eletrodeionização	Ótima eliminação de contaminantes dissolvidos ionizados	Apresenta eliminação insuficiente para bactérias. Não elimina pirogênicos e partículas em suspensão
Adsorção por carvão vegetal ativado	Ótima descontaminação de contaminantes orgânicos e agentes oxidantes.	Apresenta eliminação baixa de partículas em suspensão, não elimina contaminantes ionizados dissolvidos. Não elimina micro-organismos e pirogênicos. Proporciona crescimento microbiano.
Radiação UV	Apresenta ótima ação germicida, oxidação de compostos orgânicos e redução de carga microbiana.	Não elimina pirogênicos, partículas em suspensão, gases e sólidos ionizados.
Microfiltração	Ótima eliminação de micro-organismos, elimina parte de contaminação viral agregada a bactérias, materiais particulados, capaz de realizar separação sólido-líquido e água-óleo.	Não esteriliza. Pode ocorrer formação de biofilme. Não elimina gases ionizados.

Fonte: Adaptado de AQUINO(2011), BRASIL (2010), FARRUGIA(2012).

4. CONCLUSÃO

Dos contaminantes que a água pode apresentar, os microbiológicos são os que precisam de um controle mais rigoroso por parte da indústria farmacêutica. Alguns purificadores eliminam melhor determinadas substâncias do que outros.

O método de osmose reversa foi identificado como um dos melhores por eliminar uma diversidade maior de contaminantes. Porém, por esses purificadores apresentarem eliminação mais completa quando trabalhados em conjunto, cada indústria deverá avaliar por meio de validação de processos e qualificação de equipamentos qual será a melhor forma de combinação dos aparelhos.

Através desta validação, a indústria poderá avaliar se estão funcionando corretamente dentro das conformidades determinadas pelos órgãos reguladores e definir as análises de controle de qualidade a serem realizadas.

5. REFERÊNCIAS

AQUINO, A. As diferenças entre nanofiltração, ultrafiltração, microfiltração e osmose reversa. *Rev. Meio Filtrante*, n. 53, 2011.

BRASIL. Resolução – RDC nº 17. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, 2010a.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília. 2010b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2011.

BREDA, E. M. Água grau reagente para laboratório e outros fins especiais. CRQ 02300/276, 2001.

FARRUGIA, B. Fornecendo água ultrapura, sistemas de eletrodeionização (EDI) conquistam novos mercados. *Rev. Meio Filtrante*, n. 45, 2012.

ORISTANIO, B.; PEIG, D; LOPES, M. Desenvolvimento de um sistema de prétratamento para osmose reversa. Projeto de Formatura em Engenharia Ambiental. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP. 2006.

RODRIGUEZ *et al.* Subproductos de ladesinfección del agua potable: Formación, aspectos sanitarios y reglamentación. *INCI*, v. 32, n. 11, 2007.

SILVA *et al.* Manual de métodos de análises microbiológica da água. São Paulo: Varela, 164p, 2005.

CAPÍTULO XXVII

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DOWNSTREAM PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Sandro de Sousa Leal¹

Flaviana Alves dos Santos²

Maria Danielly Lima de Oliveira³

César Augusto Souza de Andrade³

¹UniNovartis, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

³Departamento de Bioquímica, UFPE.

E-mail de contato: sandro.lealxd@gmail.com

RESUMO – *Os biofármacos têm melhorado consideravelmente a terapêutica de muitas doenças e, em certos casos, apresentam-se como a única terapia disponível para determinadas doenças. Os custos associados ao tratamento são elevados, reflexo dos custos envolvidos nos processos produtivos do biofármaco. O desenvolvimento de um processo downstream requer uma série de etapas, iniciando-se desde os ensaios laboratoriais, experimentos em*

equipamentos miniaturizados até a escalabilidade para produção industrial e validação. A utilização de ferramentas como o DoE, QbD e experimentos HTPS podem fornecer um rápido desenvolvimento do processo. Dentre as técnicas tradicionais utilizadas para a separação e purificação nas cascatas downstream, a cromatografia é amplamente utilizada, incluindo também floculação, filtração, precipitação, ultrafiltração, cristalização, dentre outras. O complexo entendimento do processo, baixa preditabilidade na operação validação são barreiras para incorporação dessa técnica na indústria. A integração das diferentes técnicas associada aos requerimentos de qualidade, segurança e eficácia do produto, bem como a redução de custos desnecessários do processo tem sido o foco para melhorias do processamento downstream. Os estudos econômicos de processo e simulação de custos de cenários produtivos são uma ferramenta útil para avaliação do processo, determinando-se quais recursos estão superousub-allocados em cada etapa, além de possibilitar a redução de custos de produção.

Palavras chave: Processamento *downstream*; Sistemas aquosos de duas fases; Biofármacos

1. INTRODUÇÃO

Os biofármacos tem melhorado consideravelmente a terapêutica de muitas doenças e, em certos casos, apresentam-se como a única terapia disponível para uma doença em particular. Estes produtos biológicos, incluindo proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e ácidos

nucleicos medicinais, têm demonstrado grande aplicabilidade em diversas áreas como no desenvolvimento de vacinas, imunizações, oncologia, doenças autoimunes, cardiovasculares e neurodegenerativas (WALSH, 2005).

Além de uma alta taxa de eficácia, os biofármacos também estão dentre as drogas mais caras do mercado farmacêutico. O custo anual por paciente, por exemplo, pode chegar a \$40000 dólares, com anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer (FARID, 2008; ROSA et al., 2010). Em alguns casos, com a necessidade de uso constante por longos períodos e altas doses, o custo do tratamento pode ser ainda maior (ROSA et al., 2010).

O desenvolvimento de um processo para a produção em escala industrial dos biofármacos geralmente inicia numa escala laboratorial, com a construção e seleção dos vetores de expressão apropriados para a biomolécula, bem como a seleção dos microrganismos produtores. Em seguida, prossegue-se com a seleção e otimização das condições fermentativas para a produção da biomolécula em biorreatores. Tais etapas constituem o processamento *upstream* do processo produtivo. Após a fermentação, torna-se necessário a realização das etapas de recuperação do produto, isolamento e purificação, constituindo o processamento *downstream*. As três etapas do processo (*upstream*, fermentação e *downstream*) são integradas e não devem ser abordadas num foco individual, pois cada etapa possui impacto no custo do processo produtivo (KELLEY, B.; HATTON, T., 1991; FERREIRA, G. N. M. et al., 2000).

Nos últimos anos, a tecnologia *upstream* de produção de biofármacos tem sido continuamente aprimorada devido aos avanços nos mecanismos moleculares e genéticos, bem como às inovações dos meios de crescimento, aumentando o volume de produção (GOTTSCHALK, U., 2008; AZEVEDO, A. M. et al., 2009). Entretanto, os processos *downstream* tem causado um “gargalo” na produção, sendo uma das etapas mais custosas. De fato, estima-se que as etapas *downstream* na produção biofarmacêutica possam chegar a cerca de 80% do custo de manufatura total (ROQUE, A. C. A., 2004).

As etapas limitantes do processo *downstream* podem ser rapidamente identificadas, já que com as fases de recuperação, isolamento e polimento perfazendo apenas cerca de 20% dos custos, as principais limitações encontram-se nas fases de purificação seletiva, atualmente dominadas pelos processos cromatográficos (PRZYBYCIEN, T. M. et al., 2004), que contribui com cerca de 70% dos custos *downstream*. Outras alternativas não-cromatográficas para a purificação seletiva têm sido descritas na literatura tais como precipitação por afinidade, particionamento aquoso de duas fases, filtração tangencial de alta performance, cromatografia por membranas, seleção magnética de alto gradiente e cristalização (PRZYBYCIEN, T. M. et al., 2004).

Nesse sentido, os sistemas aquosos de duas fases (ATPS) têm se mostrado como uma alternativa promissora no desenvolvimento *downstream* de processamento e purificação de biofármacos. Dessa forma, é essencial desenvolver e melhorar os processos de purificação *downstream*, de modo a promover melhor eficiência do processo produtivo e menor

custo, mantendo-se ainda um alto padrão de qualidade para aprovação pelo mercado farmacêutico (ROSA et al., 2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o levantamento e apresentação dos dados relacionados ao estudo de revisão bibliográfica abordou-se três etapas distintas: Foi realizada inicialmente uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratório, para o embasamento teórico acerca do tema tratado. Numa segunda etapa, desenvolveu-se a leitura, análise e interpretação dos artigos pesquisados, de modo agrupar os estudos semelhantes e contrapor os diferentes pontos de vista apresentados. Além disso, levantou-se os principais avanços e tecnologias em desenvolvimento para os tópicos considerados na revisão. Por fim, realizou-se uma análise crítica acerca dos estudos pesquisados, levantando algumas proposições com base no entendimento dos processos estudados.

Para esquematização do estudo foram elaboradas tabelas, figuras, esquemas e fluxogramas para facilitar o entendimento. Para a pesquisa bibliográfica foi utilizado busca em bancos de dados de periódicos nacionais, internacionais e sites de busca (Science Direct, PubMed, Scopus, Scielo, Google Acadêmico, dentre outros), além de teses e dissertações nacionais e internacionais que tratassem sobre o tema em estudo, bem como apresentações técnicas em feiras e congressos de tecnologia farmacêutica. Os critérios de pesquisa incluíram a preferência por artigos recentes (2007-2015) e estudos técnicos, centrado na

avaliação de casos na indústria farmacêutica sobre o tema objeto da pesquisa.

Alguns dos termos que foram utilizados na pesquisa são: *downstream processing*, *bioprocessing*, *mAB processing*, *aqueoustwo-phase systems*, *biopharmaceuticals*, *monoclonal antibodiespurification*, *chromatography*, *manufacturing*, *downstream economics*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, a produção de biofármacos está influenciada fortemente pelo custo envolvido nas etapas de separação e purificação ou processamentodownstream. Podendo representar até 90% dos custos de produção do produto de interesse, a purificação do biofármaco invariavelmente é uma etapa onerosa do processo biotecnológico, o que também é refletido no alto custos dos medicamentos produzidos por esse modo. As exigências de pureza e concentração para as proteínas utilizadas na terapêutica humana, estabelecidas pelas agências regulatórias, são cada vez mais rígidas, levando às indústrias a centrarem esforços no desenvolvimento de tecnologias de processamento *downstream* mais robustas, confiáveis e eficazes.

Observou-se que há uma tendência crescente de adaptação da indústria para que possam lidar com uma maior diversidade de produtos, suportar os volumes de produção e ter uma faixa mais ampla quanto à produtividade. O modelo de uma instalação dedicada a um único produto é

ultrapassado, sendo as instalações mais recentes adaptadas a menor escala e modelos flexíveis de processo. O problema é que embora as tecnologias *upstream* possam ter essa flexibilidade de maior ou menor escala, a infraestrutura para os processos *downstream* permanecem fixas, e o que é pior, a alta produtividade sobrecarrega os sistemas de processamento, já que tem que lidar com meios cada vez mais ricos de produto. Com uma aproximação de desenho do projeto baseada em custo, a indústria biotecnológica busca adaptar ou otimizar seus processos para resultar num esquema de biomanufatura com menor consumo de recursos, incluindo, por exemplo, menor consumo de água, de energia, além de redução do impacto ambiental.

A cromatografia, embora seja considerada operação essencial no processamento *downstream* de biofármacos, exige uma grande quantidade de etapas para que a operação seja bem-sucedida, envolvendo um pré-tratamento do fluxo de entrada no sistema (*inflow*) bastante intensivo, além da utilização de grandes volumes de fase móvel e tempo de recirculação no sistema.

O impasse que as indústrias de biotecnológicos enfrentam é a redução dos custos envolvidos nas etapas cromatográficas uma vez definido o projeto de processamento *downstream*. Há possibilidade de reduzir a quantidade de etapas, ou mesmo desenvolver um processo sem a utilização da cromatografia? Há possibilidade da eliminação do “gargalo” produtivo, causado pela demora no processamento?

Diante do panorama atual de produção, observou-se que dificilmente a cromatografia cederá espaço completamente a um processo de purificação inteiramente não-cromatográfico. Isto se deve provavelmente pela técnica ser amplamente difundida em processos biotecnológicos, com etapas bem reconhecidas e passíveis de validação e integração ao processo *downstream*. Ao mesmo tempo que se deseja redução de custos, também se deseja que a manufatura ocorra dentro do menor tempo possível, de modo reproduzível e confiável. Sendo assim, durante os processos de transferência de tecnologia a cromatografia continua sendo a técnica “failproof” para a indústria.

Entretanto, como observado nos vários estudos realizados, a busca por outras técnicas que possam intensificar o processo *downstream* e assim proporcionar redução de custos, vem tomando parte importante no pensamento estratégico das empresas. As tecnologias são testadas em experimentos em miniatura, ou até mesmo em instalações piloto, próprias para adequar os experimentos de bancada em relação à sua escalabilidade industrial.

Com resultados promissores, o projeto é levado adiante, muitas vezes acompanhado de estudos de avaliação econômica, em comparação com a técnica padrão. Por exemplo, em estudo recente, Eggersgluess et al (2014) projetaram e desenvolveram um sistema de ATPS para integração no processamento *downstream*. Com modelamento e otimização do sistema sendo bem-sucedido, foi feita uma avaliação de custos do processo, comparando-se com a técnica envolvendo a cromatografia da Proteína A (tradicional). Para isso, simulou-se diferentes cenários de

produção, com diferentes performances da resina, etapas, ciclos de extração, títulos do produto desejado, etc, atribuindo-se um custo a cada material e consumível utilizado no processo.

De modo esperado, verificou-se que os custos individuais para lotes de menor volume são maiores que os lotes com maior volume. Isto é o que, de fato, é necessário ocorrer para produzir biofármacos a baixo custo. As indústrias necessitam ter disponibilidade de grandes capacidades de produção e grandes instalações para suportar os múltiplos biorreatores, necessitando de um grande investimento inicial para a construção e grande quantidade de recursos humanos, resultando em custos fixos bastante altos. Verificou-se também que os custos da cromatografia de proteína A são centralizados no tempo de vida das resinas e capacidade, enquanto que os custos da ATPS consistem principalmente na aquisição e descarte de materiais envolvidas na extração. A cromatografia da proteína A só foi mais em conta que a ATPS quando se trabalhou com títulos baixos do produto. Já para concentrações acima de 5 g/L e grandes volumes de lote, a ATPS possui menor custo que a cromatografia, sendo esta superior apenas se atendesse a condição de possuir resina com capacidade de retenção de 50 g/L de proteína e suportasse 300 ciclos de purificação, situação atualmente impraticável na indústria. Em outro estudo, Strube et al (2011) realizaram uma análise do processo e simulação de custos de uma patente para produção de imunoglobulina G.

De maneira similar, cada etapa envolvida no processo foi atribuída um custo, seja relacionado a materiais,

equipamentos, reagentes, recursos humanos, limpeza, descarte de resíduos, dentre outros, de modo a obter um detalhamento tanto do custo *downstream* por lote, como do custo relacionado a equipamentos, por lote. Ficou evidenciado que 1/3 dos custos totais do processo *downstream* eram alocados a materiais consumíveis, tais como resinas cromatográficas, membranas e soluções tampão.

Dos custos fixos, ou seja, aqueles relacionados a equipamentos, instalações, recursos humanos, controle e garantia de qualidade, cerca de 39% eram relacionados à cromatografia de afinidade, 13% por interações hidrofóbicas e 12% à cromatografia de troca iônica. Ou seja, 64% dos custos com equipamento são direcionados às unidades de separação cromatográfica. Percebe-se que uma série de cenários de produção podem ser estimados e detalhados do ponto de vista econômico.

A discriminação das etapas e o detalhamento dos valores podem ser auxiliados com ferramentas de software de gerenciamento de produção e com co-participação de representantes da área financeira e administrativa da empresa. Com isso a avaliação é feita não apenas no impacto econômico direto, mas também em consideração dos aspectos de rendimento e pureza necessários para o processo, bem como as considerações no âmbito regulatório.

Nas avaliações econômicas de processo, pode-se alcançar reduções de custos consideráveis sem ao menos ter que alterar drasticamente as etapas produtivas, apenas trabalhando com a re-alocação e re-aproveitamento de

recursos entre os diferentes setores envolvidos na manufatura. A incorporação de novas tecnologias de separação e purificação de biofármacos deve ser feita preferencialmente nas etapas iniciais de desenvolvimento do processo *downstream*. Uma vez integrada desde a sua concepção, torna-se bem mais fácil otimizar o sistema, permitindo economia considerável no processo produtivo como um todo e assim levando possivelmente a uma redução no custo do medicamento ao consumidor final.

Durante o estudo, observou-se que os ATPS são uma técnica interessante e com grande potencial para aplicação nos processos *downstream* industriais, já que uma grande quantidade de biomoléculas foram purificadas, ao menos em escala laboratorial, utilizando extração por ATPS. As dificuldades para “engrenar” esta técnica a nível produtivo estão basicamente no baixo conhecimento dos mecanismos que envolvem o particionamento das biomoléculas, principalmente tratando-se de um meio de difícil caracterização.

Ainda há a necessidade de validação do método, que deve demonstrar robustez, precisão e exatidão na recuperação da biomolécula e, por vezes, o comportamento imprevisível do sistema acaba dificultando o estabelecimento desses parâmetros. Contudo, entende-se que as vantagens que a técnica apresenta são capazes de superar as dificuldades de implantação.

Dois aspectos significantes são capazes de impulsionar o ATPS em larga escala: o processo de escalonamento foi descrito como simples e confiável, ou seja, uma vez definido

em escala laboratorial não haveria dificuldades na transposição de escalas. O desenvolvimento do sistema ATPS, embora seja basicamente empírico, pode ser construído utilizando doe e equipamentos de *screening* (*high-throughput*), permitindo realizar vários testes em pouco tempo.

Outro fator é que os extratores líquido-líquido já disponíveis comercialmente poderiam ser facilmente adaptados para extração por ATPS e a incorporação no bioprocessamento seria rápida. Além disso, pode-se considerar também os avanços tecnológicos dos materiais e componentes do sistema. Em relação ao modo de operação para a manufatura dos produtos biotecnológicos, a produção em batelada ainda é o principal modelo seguido pelas empresas.

O conhecimento da técnica, aliado a preditabilidade dos resultados fazem desse modo de produção ser o modelo padrão para a produção industrial. Contudo, os vários estudos econômicos com simulação de processo relatam que o modelo de produção contínua é capaz de reduzir consideravelmente os custos associados. Hammerschmidt et al (2014) relatam que a produção contínua pode fornecer biofármacos, como anticorpos, a baixo custo, enquanto se toma como vantagem de sua simplicidade e alto grau de automação.

No entanto, embora os riscos envolvidos da incorporação da perfusão contínua na rotina produtiva possam afastar sua utilização mais frequente na indústria, pode-se assumir que futuramente terá um papel bem mais

considerável, já que novas classes de produtos biotecnológicos são desenvolvidos, necessitando também de novas adaptações de processo ao modo contínuo, incorporação de novas tecnologias e combinações de técnicas de processamento *downstream*.

Observou-se que o processamento *downstream* não pode ser tratado simplesmente baseando-se em uma ou duas técnicas, ou centrada num determinado princípio. A composição complexa do meio para purificação da proteína, a necessidade de concentração da proteína alvo, além dos critérios de pureza, exigem uma combinação de diferentes técnicas para se alcançar o resultado final esperado.

A palavra-chave, neste sentido, é integração e intensificação, ou seja, fazer funcionar a cascata de purificação utilizando a menor quantidade de etapas possível, num menor tempo. Contudo, não se pode negligenciar a importância das técnicas consideradas mais tradicionais (precipitação, cristalização) frente a outras de maior sofisticação, já que cada uma são complementares a outra, oferecendo versatilidade ao arsenal de purificação da indústria de biotecnológicos.

4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, percebe-se que o processamento *downstream* na indústria biofarmacêutica é uma etapa fundamental dentro do processo produtivo total, não apenas por alocar a maior fatia dos investimentos e custos de processo, mas também por ser a etapa limitante, o “gargalo”

na produção. Com o crescimento cada vez mais significativo do segmento biofarmacêutico, aliado ao avanço tecnológico e a possibilidade de produção de biomoléculas com concentrações cada vez maiores e mais complexas, as limitações na separação cromatográfica representam um problema a ser cuidado num futuro próximo. No estudo, foram abordadas as diferentes técnicas empregadas na cascata *downstream* de purificação, que podem se apresentar como alternativas não cromatográficas, principalmente pelo surgimento de novas tecnologias de construção de materiais, resinas, polímeros e ligantes cada vez mais seletivos para o biofármaco desejado.

Em especial, abordou-se a técnica de extração utilizando os ATPS, que se apresentam como uma alternativa interessante às custosas etapas cromatográficas do processo, oferecendo boa escalabilidade, capacidade de operação em modo contínuo e boa capacidade de adaptação à cascata *downstream*.

5. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, A. M., ROSA, P. A., FERREIRA, I. F., AIRES-BARROS, M. R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Ter. in Biot.*, v. 27(4), p. 240-247, 2009

EGGERSGLUESS, J., WELLSANDT, T., STRUBE, J. Integration of Aqueous TwoPhase Extraction into *Downstream* Processing. *Che. Eng. & Tec.*, v. 37(10), p. 1686-1696, 2014.

FARID, S. S. Process Economic Drivers in Industrial Monoclonal Antibody Manufacture. In: (Ed.). Process

Scale Purification of Antibodies: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

FERREIRA, G.N., MONTEIRO, G. A., PRAZERES, D. M., CABRAL, J. M. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Ter. in Biot.*, v. 18(9), p. 380-388, 2000.

GOTTSCHALK, U. Bioseparation in Antibody Manufacturing: The Good, The Bad and The Ugly. *Bio. Pro.*, v. 24(3), p. 496-503, 2008.

HAMMERSCHMIDT, N., TSCHELIESSNIG, A., SOMMER, R., HELK, B., JUNGBAUER, A. Economics of recombinant antibody production processes at various scales: Industry-standard compared to continuous precipitation. *Biot. Jour.*, v. 9(6), p. 766-775, 2014.

KELLEY, B., HATTON, T. The fermentation/downstream processing interface. *Biosep.*, v. 1(5), p. 333-349, 1991.

PRZYBYCIEN, T. M., PUJAR, N. S., STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Cur. Opi. in Biot.*, v. 15(5), p. 469-478, 2004.

ROQUE, A. C. A., LOWE, C. R., TAIPA, M. Â. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. *Biot. Pro.*, v. 20(3), p. 639-654, 2004.

ROSA, P. A., FERREIRA, I. F., AZEVEDO, A. M., AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Jour. of Chrom. A*, v. 1217(16), p. 2296-2305, 2010.

STRUBE, J., GROTE, F., JOSCH, J. P., DITZ, R. Process Development and Design of Downstream Processes. *Che. Ing. Tec.*, v. 83(7), p. 1044-1065, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Ter. in Biot.*, v. 23(11), p. 553-558, 2005.

CAPÍTULO XXVIII

ABORDAGEM DO BIOPROCESSO EM ESCALA INDUSTRIAL, COM ÊNFASE NAS DIFICULDADES NAS ETAPAS *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* QUE POSSAM COMPROMETER A OBTENÇÃO DO PRODUTO FINAL

Vanessa da Silva Luna¹

Douglas Carvalho Francisco Viana²

Maira Galdino da Rocha Pitta²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo⁴

Michelly Cristiny Pereira²

¹UniNovartis, Universidade Federal De Pernambuco, UFPE

²Nucleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica, NUPIT/UFPE

E-mail de contato: luna.farmaceutica@gmail.com

RESUMO – *Os processos biotecnológicos oferecem possibilidades inovadoras para a produção de uma ampla variedade de produtos e processos com um elevado grau de pureza, a partir do uso de células ou sistemas bioquímicos. Os bioprocessos são compostos por três etapas*

fundamentais: (1) tratamentos iniciais ouupstream process; (2) a produção propriamente dita; e (3) os tratamentos finais ou downstream process.o objetivo deste trabalho foi delinear as principais etapas dos bioprocessos, com ênfase em uma abordagem de possíveis dificuldades que possam surgir nas fases antecedentes (upstream) e precedentes (downstream) e que venham a comprometer a obtenção do produto final. Para isto, foi realizada uma revisão bibliográfica referente ao tema proposto, utilizando as palavras-chave upstream, downstream e bioprocessos e seleção daqueles que possuem dados direcionados ao delineamento desta pesquisa. Foi possível observar que inúmeras dificuldades podem surgir em virtude do mau planejamento e execução das técnicas envolvidas nas etapas dos processos biotecnológicos convencionais, as quais certamente irão comprometer a obtenção ou o rendimento do produto final. Desse modo, tendo em vista que o rendimento do produto final do bioprocessos depende estritamente do planejamento correto das técnicas aplicadas, pode-se afirmar que este delineamento contribui substancialmente para os custos totais da obtenção de uma biomolécula.

Palavras chave: Bioprocessos; Upstream; Downstream; Proteínas.

1. INTRODUÇÃO

Os processos para obtenção de produtos farmacêuticos em escala industrial podem ser classificados basicamente em dois tipos: químicos e bioquímicos ou bioprocessos. A distinção entre estes dois tipos está fundamentada na natureza

dos catalisadores utilizados em suas reações. Enquanto os processos químicos decorrem de reações químicas, os bioprocessos são conduzidos mediante ação de agentes biológicos, sendo, portanto, as transformações catalisadas enzimaticamente (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Os processos biotecnológicos oferecem possibilidades inovadoras para a produção de uma ampla variedade de produtos e processos com um elevado grau de pureza, a partir do uso de células ou sistemas bioquímicos (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008). Por definição, consistem no conjunto de tecnologias habilitadoras (enabling technologies), que possuem em comum o uso de células ou moléculas biológicas para aplicações na produção de bens e serviços, em áreas como saúde humana e animal, agricultura, energia e meio ambiente (MARX, 1989).

Estes processos apresentam caráter inter e multidisciplinar, englobando conhecimentos nas áreas da Bioquímica, Genética, Microbiologia Aplicada e Engenharia Bioquímica, de modo a proporcionar uma maior compreensão sobre a atividade do biocatalisador e otimizar o desempenho dos processos (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008). Basicamente, devem ser consideradas três etapas fundamentais dos bioprocessos, a saber: (1) os tratamentos iniciais ou upstream process, que envolvem operações como tratamento da matéria-prima, o preparo e esterilização dos meios de crescimento, bem como a adequação do sistema às condições previamente estabelecidas, de modo a proporcionar o melhor desempenho do processo; (2) a produção propriamente dita ou process,

que consiste na transformação do substrato em produto nos biorreatores, em condições devidamente monitoradas; e (3) os tratamentos finais ou downstream process, que englobam a separação e a purificação dos produtos e tratamentos dos resíduos formados (BORZANI et al., 2001; PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

É importante que os bioprocessos sejam avaliados tanto do ponto de vista econômico como em relação aos padrões crescentes de confiabilidade e reprodutibilidade. Tendo em vista que o sucesso de um determinado processo depende da correta definição das condições para o seu desenvolvimento, torna-se indispensável o conhecimento das etapas e componentes que o constitui. Problemas na escolha do microrganismo, com o meio de cultura, na forma de condução do processo fermentativo e nas etapas de recuperação do produto constituem as principais causas de comprometimento do rendimento dos bioprocessos. Desse modo, dadas as peculiaridades e a complexidade dos sistemas em que se desenvolvem os processos biotecnológicos, torna-se necessário entender estas dificuldades, riscos e consequências, bem como maneiras de solucioná-los ou evitá-los.

Neste contexto, o presente trabalho objetiva delinear as principais etapas dos bioprocessos, com ênfase em uma abordagem das possíveis dificuldades que possam acontecer nas fases antecedentes (upstream) e precedentes (downstream) e que venham a comprometer a obtenção do produto final.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi construído através de uma revisão bibliográfica referente ao tema proposto, com base na pesquisa de periódicos indexados, dissertações, teses e livros, utilizando as palavras-chave upstream, downstream e bioprocessos e seleção daqueles que possuem dados direcionados ao delineamento desta pesquisa.

Após a seleção, o material passou por leitura exploratória e análise minuciosa das ideias que se relacionam ou se contrapõem acerca do tema proposto. Nesta etapa foi possível selecionar os dados necessários, atribuir interpretação e relacioná-los ao tema do estudo em questão, objetivando a elaboração textual.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso de um bioprocessamento depende da correta definição de quatro pontos relacionados às condições para seu desenvolvimento: microrganismo, meio de cultura, forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto. Com base nisto, torna-se indispensável o conhecimento das etapas e componentes que o constitui. Problemas nas etapas do bioprocessamento constituem as principais causas de comprometimento do rendimento do produto final. Como por exemplo, a célula microbiana responsável pela transformação em um dado processo realiza também um grande número de outras reações de interesse

para a sua sobrevivência e multiplicação. Situações como estas podem dificultar o estabelecimento de balanços materiais, além de afetar o rendimento do processo. O conhecimento das prováveis vias metabólicas que se desenvolvem nas células é, neste caso, de grande auxílio, fornecendo muitas vezes informações que indicam a maneira mais adequada de conduzir o processo que nos interessa (SCHMIDELL et al., 2001).

3.1. Processos upstream

Consiste nas etapas que antecedem a produção propriamente dita, as quais serão discorridas a seguir.

3.1.1. Seleção e conservação do microrganismo biocatalisador

Em geral, bactérias e fungos são os microrganismos responsáveis pela maioria dos processos biotecnológicos farmacêuticos. A seleção do microrganismo biocatalisador deve ser fundamentada no cumprimento dos seguintes critérios: (1) apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto; (2) permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do mesmo no caldo fermentado; (3) não produzir substâncias incompatíveis com o produto; (4) apresentar estabilidade quanto ao comportamento fisiológico; (5) não ser patogênico; (6) não exigir condições de processo muito complexas; (7) não exigir meios de cultura dispendiosos; e (8) permitir a rápida liberação do produto para o meio (SCHMIDELL et al 2001).

As matérias primas incidem pesadamente nocusto do produto final. Desse modo, é desejável que o microrganismo permita um elevado acúmulo do produto no meio, sem sofrer inibição mais acentuada em virtude deste acúmulo (STANBURY; WHÍTAKER; HALL, 1995). Outra característica refere-se à estabilidade fisiológica da linhagem a ser empregada industrialmente. Isso significa que não basta que se tenha uma linhagem hiperprodutora de uma dada substância de interesse, mas que se conheçam as técnicas mais adequadas para a sua conservação e, mais ainda, que ela se mantenha como excelente produtora da substância de interesse ao longo de todas as etapas envolvidas, desde sua proliferação em nível de laboratório, germinadores e biorreator principal (STANBURY; WHÍTAKER; HALL, 1995; SCHMIDELL et al., 2001).

A operação de biorreatores de grande porte, do ponto de vista técnico e econômico, estabelece o emprego de microrganismos não patogênicos, os quais possam ser manuseados sem riscos ambientais. (STANBURY; WHÍTAKER; HALL, 1995; SCHMIDELL et al., 2001). No caso da produção de vacinas, onde se trabalha com o cultivo de microrganismos patogênicos em reatores de pequeno porte, estes estão confinados em câmaras assépticas, de modo a se tomar as precauções necessárias para a não ocorrência de contaminação do meio ambiente (SCHMIDELL et al., 2001).

Para cada microrganismo, existem valores ótimos de pH e da temperatura, no entanto, se sabe que o controle preciso de tais parâmetros apenas é possível em reatores de bancada, sendo que em reatores de grande porte (dezenas de

milhares de litros), deverá ocorrer uma certa heterogeneidade ao longo da altura do reator, causando uma flutuação nos valores destas grandezas. O ideal é que o microrganismo apresente uma faixa de valores ótimos dessas grandezas, particularmente no que se refere ao acúmulo do produto. Nessa direção, são de interesses microrganismos que consigam manter um bom desempenho, quando cultivados em baixas concentrações de oxigênio dissolvido (SCHMIDELL et al., 2001).

Particularmente na área de produção de vacinas, costuma-se utilizar meios de cultura complexos e onerosos, assim como nos cultivos envolvendo células animais, mas nestes casos os volumes de reação são relativamente pequenos e os produtos gerados podem ser considerados como de alto valor agregado. (STANBURY; WHÍTAKER; HALL, 1995; SCHMIDELL et al., 2001).O microrganismo selecionado para um processo industrial não deve exigir meios de cultura onerosos. Essa é a razão pela qual um maior conhecimento das necessidades nutricionais de uma linhagem é estudo de vital importância, objetivando o fornecimento dos nutrientes apenas necessários.

Finalmente, é de interesse para o bioprocessos que a linhagem selecionada libere fácil e rapidamente o produto para o meio, de onde ele será recuperado nas etapas seguintes ao processo fermentativo. Além do aspecto ligado a uma eventual inibição do próprio microrganismo, pela retenção de um dado produto do metabolismo, ainda cumpre lembrar que, com frequência, a primeira etapa de recuperação do produto significa a separação do microrganismo (por centrifugação ou filtração), trabalhando, a seguir, com o líquido isento de

células e estas descartadas. (STANBURY; WHÍTAKER; HALL, 1995; SCHMIDELL et al., 2001).

Uma vez definido o microrganismo que será utilizado no processo biotecnológico, é importante ainda definir o modo de obtenção do mesmo. De acordo com Prescott, Harley & Klein (2002), a obtenção dos microrganismos pode ser feita através de isolamento a partir de recursos naturais; compra em coleções de culturas; obtenção de mutantes naturais; obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética.

Dentre os meios de obtenção supracitados, a compra em coleções de culturas representa a mais conveniente, tendo em vista a existência de muitas coleções de culturas em vários países e a facilidade de obtenção das mesmas (SCHMIDELL et al., 2001; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002). Contudo, nem sempre o microrganismo de interesse pode ser encontrado dentre coleções as culturas disponíveis no mercado.

Quando há dificuldades de obtenção da cepa, pode-se lançar mão de programas de melhoramento genético. Nas últimas décadas, as técnicas de engenharia genética, também designadas por técnicas ou tecnologia de DNA recombinante, sem dúvida trouxeram um imenso avanço nas possibilidades de se obter células mais produtivas, ou células produtoras de substâncias que normalmente não produzem. A introdução de fragmentos de DNA de certas células em outras, via vetores como os plasmídeos, permite a obtenção de células alteradas geneticamente, porém de forma muito mais dirigida do que as

metodologias convencionais anteriormente mencionadas, sendo possível de ser executada não apenas com microrganismos, mas igualmente com células animais e vegetais (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

É importante frisar que os agentes biológicos utilizados em processos industriais devem ser adequadamente preservados e conservados como cultura pura. Uma variedade de nutrientes é utilizada para os fins acima referidos, incluindo-se fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais. Através de diferentes técnicas é possível manter todas as características da população microbiana de interesse e, dessa forma, sempre que uma nova produção é iniciada, a qualidade do produto também é mantida. As técnicas de manutenção e preservação de microrganismos incluem: repiques periódicos, conservação em parafina, em glicerol, liofilização, criopreservação, etc (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

3.1.2. Preparo do meio de cultura a ser processado

A formulação de um meio de cultivo deve levar em conta as informações sobre as exigências nutricionais do agente a ser cultivado, de forma que não existe uma formulação padrão para o desenvolvimento de microrganismos em condições artificiais (MOO-YONG, 2007). Buscam-se, então, as fontes adequadas que possuam os componentes necessários ao bom desempenho da célula. Pereira Jr., Bon & Ferrara (2008) colocam que a viabilidade técnica, os balanços mássicos e energéticos e a economicidade são aspectos relevantes que devem ser

considerados na escolha da matéria-prima. Em geral, esta deve apresentar as seguintes características: (1) composição adequada ao crescimento do agente biológico e à formação do produto de interesse; (2) baixo custo de obtenção, beneficiamento, transporte e estocagem; (3) elevada disponibilidade e facilidade de padronização dos componentes; (4) auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, o que evita variações drásticas de pH, ou evitar uma excessiva formação de espuma; (5) não contribuir para dificultar os processos de separação do produto; e (6) não causar dificuldades no tratamento final do efluente.

De uma forma geral, embora os meios possuam complexos nutricionais, dependendo da finalidade do bioprocessamento e das exigências dos microrganismos, é importante complementar o meio com componentes que faltam, e retirar aqueles que inibem, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão do substrato em produto com o rendimento desejado. Quanto maior o atendimento às exigências nutricionais, mais apta estará a célula viva a responder aos estímulos externos. Consequentemente, mais eficiente será a conversão do produto de interesse e maior a produtividade (VAZ; PRADO; CARVALHO, 2008).

Meios enriquecidos, mesmo sendo mais onerosos, podem ser preferidos, caso realmente permitam uma maior economia nas etapas de recuperação do produto. Para uma grande variedade de linhagens, há a necessidade ainda da adição de "fatores de crescimento", ou seja, alguns aminoácidos específicos ou vitaminas (como biotina, tiamina,

riboflavina etc.). Quando se conhecem essas necessidades específicas, o que nem sempre é o caso, é possível adicionar essas substâncias puras, a fim de manter o meio em sua forma mais definida, mas o custo destes meios pode tornar-se inviável, particularmente para instalações de grande porte, a menos que isto signifique um enorme ganho econômico na recuperação do produto, ou preserve alguma característica fundamental deste produto, necessariamente de alto valor agregado (VAZ; PRADO; CARVALHO, 2008; PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Alternativamente, para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, com características nutricionais mal conhecidas, podem-se adicionar certos materiais complexos como: extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona (hidrolisado de proteínas) etc. Esses materiais, individualmente ou adicionados conjuntamente, permitem introduzir os fatores faltantes em um meio definido, mas, além de onerosas, são complexas e de composição variável ao longo do tempo de armazenagem e na dependência do fabricante e do lote empregado. Assim, pode-se imaginar a ocorrência de oscilações no processo fermentativo, além de possíveis dificuldades nas operações de recuperação do produto final, dependendo das características deste produto e das operações de recuperação (VAZ; PRADO; CARVALHO, 2008; PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Quando o agente biológico for enzimas, ou mesmo quando estas biomoléculas são os produtos do bioprocessamento, a atividade e a estabilidade enzimáticas são fortemente

dependentes da força iônica do meio, temperatura, pH e da relação entre a concentração de substrato e de enzima. Estas variáveis básicas influenciam o desempenho catalítico das enzimas por afetarem suas conformações, estejam elas livres ou imobilizadas. Estudos devem ser conduzidos previamente a fim de se eleger as condições ótimas para a catálise enzimática (LAMBERT; MEERS, 1983).

Uma grande variedade de matérias primas, geralmente provenientes da agroindústria, é utilizada como substrato, como por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar e o melaço obtido desta mesma planta (MITCHELL; KRIEGER; STUART, 2000). Embora o emprego destes substratos naturais represente um benefício no tocante à sustentabilidade, pois aproveita resíduos agroindustriais e florestais como matérias primas para uma grande variedade de bioconversões, a composição química dos nutrientes de interesse está condicionada a uma série de fatores, tais como solo, variedade do vegetal, safra, clima, processamento durante a colheita e estocagem etc. Esses fatos indicam já a expectativa de que possam ocorrer oscilações no processo fermentativo que emprega essas matérias-primas, além de obrigarem as empresas a manterem instalações piloto para o ajuste da composição do meio a cada novo lote de matéria-prima que a empresa recebe. Inclusive essas matérias-primas naturais podem causar problemas adicionais na recuperação e purificação do produto final, assim como problemas nos tratamentos dos resíduos. No entanto, ainda continuam a serem as matérias-primas preferidas em grande número de casos, pela simples razão de ser mais econômica.

3.1.3. Esterilização de meios e equipamentos

A presença de microrganismos contaminantes em processos fermentativos pode levar a prejuízos. No caso da produção de penicilina, por exemplo, os contaminantes podem produzir penicilinase, enzima que decompõe a penicilina, resultando meios fermentados com baixa ou mesmo nula concentração do antibiótico de interesse. (SCHMIDELL et al., 2001).

Há bioprocessos bastante exigentes quanto à esterilidade dos meios de cultivo, havendo, também, grande rigor asséptico não só no transporte do meio esterilizado ao biorreator, bem como no próprio sistema reacional. Pode-se citar como exemplos de processos que demandam esterilização: a produção de antibióticos, vacinas, vitaminas e enzimas. Por outro lado, outros requerem apenas uma esterilização incipiente (pasteurização), tendo em vista que o próprio produto age como uma ‘barreira’ à contaminação, devido ao seu caráter tóxico aos microrganismos contaminantes. A bioprodução de combustíveis, solventes e ácidos orgânicos insere-se neste último caso (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008; PEREIRA JR., 1991).

Há também bioprocessos em que se prescinde totalmente de assepsia, como é o caso dos biotratamentos, nos quais a microbiota nativa ou exógena, atuando de forma consorciada, é extremamente desejável para se reduzir da carga orgânica poluidora. O processo de esterilização é geralmente conduzido por agentes físicos. Os mais empregados são o calor (seco e úmido), a filtração através de

membranas microporosas e as radiações (especialmente a ultravioleta). (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008; PEREIRA JR., 1991).

Para um melhor entendimento, faz-se necessário diferenciar os dois principais processos de esterilização de meios em escala industrial, utilizando-se vapor como fluido de aquecimento: o processo descontínuo (também chamado processo de batelada) e o processo contínuo. No processo descontínuo, o meio é quase sempre colocado no fermentador e, a seguir, aquecido com vapor. Nessas condições, esterilizam-se simultaneamente o meio e o fermentador. O aquecimento do sistema pode ser efetuado, quer borbulhando-se diretamente vapor no meio (aquecimento com vapor direto), quer passando-se vapor por uma serpentina mergulhada no meio ou por uma camisa que envolve o fermentador (aquecimento com vapor indireto). Em qualquer dos casos, o meio é agitado mecanicamente, a fim de assegurar, tanto quanto possível, a mesma temperatura em todos os pontos do sistema. O aquecimento com vapor direto acarreta, obviamente, diluição do meio (da ordem de 10 a 15%), como consequência da condensação do vapor injetado (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008; PEREIRA JR., 1991; SCHMIDELL et al., 2001).

De acordo com Schmidell e colaboradores (2001). Neste tipo de esterilização distinguem-se nitidamente três fases, a saber:

- Aquecimento, que eleva a temperatura inicial do meio (sempre próxima da temperatura de preparo do meio)

até à temperatura de esterilização (geralmente da ordem de 120°C);

- Esterilização, na qual a temperatura é mantida aproximadamente constante durante um intervalo de tempo adequado, chamado tempo de esterilização;
- Resfriamento, quando, com auxílio de água fria passando pela serpentina ou pela camisa, a temperatura é reduzida até se atingir a temperatura de fermentação.

A rigor, a destruição térmica dos microrganismos não se dá apenas na fase chamada "esterilização". No aquecimento, e também durante o resfriamento, enquanto a temperatura for superior à denominada "temperatura mínima letal" (da ordem de 80 a 100°C), também há destruição de microrganismos (SCHMIDELL et al., 2001).

Se, por um lado, a esterilização descontínua apresenta a vantagem de esterilizar simultaneamente o meio e o fermentador, reduzindo assim os perigos de contaminação nas operações de transferência do meio para a dorna, ela apresenta, por outro lado, algumas sérias desvantagens, tais como (1) manutenção do meio em temperaturas relativamente altas (acima de 100°C), por períodos bastante longos (da ordem de algumas horas), favorecendo o desenvolvimento de reações químicas no meio com possíveis alterações indesejáveis em sua composição (decomposição de nutrientes, por exemplo); (2) elevados consumos de vapor (no aquecimento) e de água (no resfriamento), resultantes da eficiência relativamente baixa do sistema de troca de calor;

(3) problemas de corrosão ocasionados pelo contato prolongado do fermentador com o meio aquecido; e (4) tempo "não produtivo" relativamente elevado, uma vez que o fermentador é utilizado apenas como um tanque de esterilização durante o processo de destruição dos contaminantes (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008; PEREIRA JR., 1991; SCHMIDELL et al., 2001).

Neste sentido, esta modalidade de esterilização vem sendo substituída, sempre que possível, pela esterilização contínua, na qual se preserva mais a integridade dos constituintes do meio, já que o aquecimento e o resfriamento são praticamente instantâneos, não havendo variação de temperatura na seção de espera, que retém o meio de cultivo a ser esterilizado em temperaturas elevadas, por curto tempo de exposição. No processo contínuo de esterilização, o meio recentemente preparado é enviado ao trocador de calor, onde atua como fluido de resfriamento do meio já esterilizado e ainda quente. Desse trocador de calor, o meio, agora preaquecido, mistura-se com vapor enviado ao injetor, onde a temperatura sobe quase instantaneamente, até alcançar a temperatura de esterilização.

Ao se comparar os dois métodos de esterilização, observa-se que o processo contínuo apresenta, em relação ao descontínuo, algumas vantagens (SCHMIDELL et al., 2001):

- Por se trabalhar a temperaturas mais elevadas, e também por serem muito rápidas as operações de aquecimento e resfriamento do mosto, o tempo de permanência do meio em alta temperatura é relativamente pequeno (da ordem de 5 a 15 min), o

que acarreta menor destruição de nutrientes; como consequência deste fato, a prática tem mostrado, em vários casos, que a fermentação de um meio esterilizado por processo contínuo apresenta rendimento substancialmente maior do que o obtido na fermentação do meio esterilizado por processo descontínuo;

- Pelo fato de ser de dimensões relativamente pequenas, o tubo de espera pode ser construído com ligas especiais, evitando a contaminação metálica (muitas vezes prejudicial à fermentação) doméstica que poderia resultar do ataque da parede do tubo pelo meio;
- Quando o meio apresenta densidade ou viscosidade relativamente alta, como no caso de mostos de cereais, o processo contínuo dispensa os motores de potência elevada que seriam necessários para o acionamento dos agitadores no processo descontínuo de esterilização; Economia de vapor, e de água de resfriamento, em relação ao processo descontínuo, desde que os trocadores de calor e o isolamento térmico da tubulação sejam adequadamente dimensionados;
- Os esterilizadores contínuos podem ser também utilizados nos processos de cozimento e sacarificação de matérias primas amiláceas. Importa, contudo, não esquecer que as viabilidades técnica e econômica do processo contínuo dependem das dimensões e do regime de trabalho dos fermentadores da instalação industrial.

3.1.4. Esterilização de oxigênio

A condução de bioprocessos em larga escala em condições de assepsia é de fato importante quando o acúmulo do produto desejado depende da ação isolada do microrganismo responsável pela síntese deste produto. Caso se trate de um processo descontínuo de fermentação, os instantes mais problemáticos são os iniciais do processo, pois é quando se tem baixa concentração do microrganismo produtor e alta concentração de substratos, o que significa alta potencialidade de contaminação do sistema. Já nos instantes posteriores tem-se uma alta concentração do microrganismo responsável pelo processo produtivo e uma baixa concentração de substratos, o que torna o caldo em fermentação menos suscetível a contaminações.

Desse modo, o nível de preocupação com a esterilização do ar depende da maior ou menor suscetibilidade do processo quanto a contaminantes. Caso o meio de cultivo, ou as condições impostas ao reator (pH, temperatura), sejam extremamente seletivos, os cuidados podem ser atenuados, mas ainda assim a ocorrência de contaminações pode interferir negativamente no que se refere à obtenção de altos rendimentos, não permitindo uma operação asséptica eficiente (PARIS; SCHMIDELL; BORZANI, 1987).

A esterilização de ar pode ser realizada por diversos processos. Um deles é a esterilização por aquecimento. Sabe-se que a resistência à destruição de microrganismos, quando submetidos ao calor seco, é bem superior quando comparada

à resistência ao calor úmido. Por esse motivo, a esterilização do ar pelo calor seco exige temperaturas relativamente elevadas, assim como tempos de permanência nestas temperaturas também elevados. Ainda, o transporte de microrganismos por partículas sólidas de poeira, em virtude da possibilidade de alguma proteção térmica, acaba contribuindo para a necessidade de condições de esterilização mais drásticas. Quando se raciocina em termos de aplicação industrial, constituída de reatores de grande porte, há a necessidade de vazões de ar bastante elevadas, o que dificulta imaginar o aquecimento de todo esse ar para atingir essas elevadas temperaturas, assim como é impossível projetar tubos de retenção ou de espera suficientemente longos, a fim de se contar com os tempos de residência prolongados a essas temperaturas (PARIS; SCHMIDELL; BORZANI, 1987).

Devido a esses problemas, a esterilização de ar por calor seco encontra apenas aplicação para pequenas instalações, como é o caso da esterilização do ar para equipamentos de laboratório ou escala piloto. Acrescente-se, ainda, que com o surgimento de sistemas de esterilização muito confiáveis, como é o caso das membranas filtrantes, a esterilização por aquecimento tornou-se alternativa muito pouco utilizada. Outra técnica para a esterilização do ar consiste no emprego de radiação. Entretanto, o emprego de uma determinada radiação deve levar em conta uma série de importantes fatores, tais como: a eficiência na destruição de microrganismos, o custo envolvido na obtenção da radiação, a periculosidade ou os efeitos colaterais de sua utilização. Assim excluem-se para esse tipo de aplicação as partículas α , prótons e nêutrons, por serem excessivamente dispendiosos

quanto à sua obtenção e aplicação prática, o mesmo ocorrendo com as radiações γ . Quando se visa a esterilização de ar, apenas as radiações ultravioleta encontram aplicação prática. Em virtude de seu baixo poder de penetração, os raios ultravioleta necessitam de tempos de exposição relativamente longos, fato este que, novamente, impede o uso deste tipo de radiação para a esterilização de ar para um processo fermentativo. (SCHMIDELL et al., 2001).

A esterilização do ar por filtração é, sem dúvida, a solução mais adequada para a obtenção de altas vazões de ar esterilizado, em virtude dos baixos custos envolvidos nesta operação, além de se dispor, presentemente, de filtros bastante confiáveis. Por esses motivos, a filtração é encontrada em praticamente todas as instalações industriais, tendo também dominado as aplicações em instalações de pequeno porte, como é o caso de instalações piloto ou de laboratório (SCHMIDELL et al., 2001).

Convém ressaltar que, qualquer que seja o sistema de esterilização do ar que se pretenda empregar, deve-se prever um filtro para cada reator, não se devendo optar, no projeto da instalação, por um sistema centralizado de esterilização, seguido da distribuição do ar para os vários reatores. Esse procedimento centralizado não é conveniente, independentemente das dimensões dos reatores e, portanto, das vazões de ar necessárias, pois se coloca em risco todo o conjunto de reatores, caso ocorra a falha do sistema de filtração. A eventual economia que se possa fazer, quanto ao investimento inicial, não justifica o risco que se irá correr ao

longo da operação da planta (SCHMIDELL et al., 2001; ROBERTSON; FRIEBÊN, 1984).

3.2. Fermentação e biotransformação

3.2.1. Biorreatores

Nos processos de fermentação, o biorreator fornece o ambiente para o crescimento e para a atividade microbiana. Durante o período de produção, previne a liberação da biomassa interna para o ambiente, assim como, impede a entrada de substâncias estranhas para dentro do meio de reações (SCHMIDELL et al., 2001; BORZANI et al., 2001).

O meio ambiente do biorreator leva em consideração os aspectos biológicos, químicos e físicos (WINKLER, 1986).

- Meio biológico: é favorável quando somente o organismo que contribui ao processo está presente, sendo denominado um sistema asséptico. Isto se consegue pela esterilização do ambiente e posterior introdução do microrganismo desejado (inoculação);
- Meio químico: está relacionado com o meio de crescimento microbiano, com as concentrações adequadas de substratos ou nutrientes microbiológicos, assim como precursores sintéticos, livres de substâncias inibidoras e mantidas ao pH adequado. Enquanto os nutrientes solúveis são adicionados ao meio, a manutenção da oxigenação é feita continuamente. Nos processos anaeróbicos, deve-se em alguns casos, dispor de dispositivos para eliminar o oxigênio continuamente. Outros

parâmetros devem ser observados, e dizem respeito à baixa atividade do meio aquoso (baixa concentração do soluto) assim como à força iônica (substâncias iônicas em solução precedente de sais);

- Meio físico: se refere principalmente à temperatura do sistema, que para seu controle leva em conta o desenho do fermentador. Este controle, bem como a necessidade em manter-se a uniformidade das condições durante o processo, está relacionado com uma boa agitação, o que por sua vez, provoca a ruptura de estruturas do organismo (cisalhamento).

3.2.2. Tipos de biorreatores

Vários tipos de biorreatores podem ser utilizados e o grau de sofisticação (desenho, construção e funcionamento) depende da sensibilidade do processo ao ambiente mantido no recipiente (WINKLER, 1986). O material utilizado na construção dos biorreatores deve ser atóxico, resistente à pressão e à corrosão química.

Quadro 1 - Classificação geral dos biorreatores

Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)
<p>Células/enzimas livres</p> <ul style="list-style-type: none">– Reatores agitados mecanicamente (STR - "<i>stirred tank reactor</i>");– Reatores agitados pneumaticamente;– Coluna de bolhas ("<i>bubble column</i>");– Reatores "<i>air-lift</i>";– Reatores de fluxo pistonado ("<i>plug-flow</i>");
<p>Células/enzimas imobilizadas em suportes</p> <ul style="list-style-type: none">– Reatores com leito fixo;– Reatores com leito fluidizado;
<p>Células/enzimas confinadas entre membranas</p> <ul style="list-style-type: none">– Reatores com membranas planas;– Reatores de fibra oca ("<i>hollow-fiber</i>");
Reatores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)
<ul style="list-style-type: none">– Reatores estáticos (reatores com bandejas)– Reatores com agitação (tambor rotativo)– Reatores com leito fixo– Reatores com leito fluidizado gás-sólido

Fonte: SCHMIDELL et al., 2001.

Conforme se pode verificar a partir da classificação proposta, há uma grande variedade de configurações possíveis para os biorreatores, discussão esta que não será abordada neste trabalho. No entanto, pode-se afirmar que os mais amplamente empregados são os reatores agitados mecanicamente (STR). (WINKLER, 1986; SCHMIDELL et al., 2001). Alguns tipos de reatores são: STR; coluna de bolhas; "air- lift"; "plug-flow"; com células imobilizadas (leito fixo); com células imobilizadas (leito fluidizado); reator com membranas planas; "hollow-fiber".

A capacidade dos biorreatores é bastante variável, podendo ser influenciada pelos seguintes fatores: (1) facilidade para transporte; (2) espaço disponível; (3) custo de produção: unidades grandes acarretam menores custos que as pequenas, principalmente se forem com instrumentação sofisticada; (4) recipientes pequenos são adequados quando se necessita uma variedade de produtos e quando existe perigo de rompimentos (VAZ; PRADO; CARVALHO, 2008).

Qualquer que seja a configuração escolhida, para processos conduzidos com rigor estéril, a construção do biorreator deve atender aos seguintes requerimentos (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008):

- Passível de ser esterilizado quando culturas puras são empregadas;
- Deve ser de simples geometria e construção, com o mínimo possível de flanges e soldas;
- Não deve conter zonas mortas;
- O material deve possuir rugosidade superficial mínima;
- Suportar carregamento (espessura de chapa compatível com o volume a ser processado);
- Deve ter capacidade de suportar altas pressões, particularmente em bioprocessos nos quais esterilização é requerida;
- Deve apresentar ótimas condições de mistura (baixo e uniformecisalhamento) e permitir uniforme suspensão de sólidos;

- Deve possuir condições de fluxo claramente definidas, com alimentação de substrato compatível com as taxas de metabolização;
- Deve possibilitar adequado transporte de massa, particularmente em relação à transferência de oxigênio, em processos aerados;
- Adequada instrumentação para o monitoramento e controle (on line ou off line) das variáveis de processo;
- Deve prever o controle de espuma;
- Flexibilidade, podendo ser empregado em outros bioprocessos;
- Estabilidade a longo termo;
- Compatibilidade com as etapas upstream e downstream;
- Fácil escalonamento.

Um dos grandes problemas existentes na operação de biorreatores decorre da dificuldade de medições de variáveis de processo a serem controladas. No caso de variáveis físicas, como temperatura, vazão, velocidade de agitação e taxa de aeração, ou físico-químicas, como pH, pressão parcial de oxigênio e a composição dos gases de saída, estas são usualmente empregadas como avaliações diretas, podendo ser medidas on line, através da utilização de sistemas de controle e outros equipamentos comerciais. Por outro lado, o controle de variáveis químicas ou bioquímicas é de difícil realização e pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de desenvolver instrumentos sensíveis para o monitoramento

destas variáveis, capazes de relacionar variações de espécies químicas com sinais elétricos ou espectrofotométricos, utilizando como elemento sensor um agente biológico (biossensores).

3.3.Processos downstream

Um dos mais complexos passos para o estabelecimento de um processo fermentativo industrial é a etapa de recuperação do produto formado, também conhecida por downstream processing. A fração do custo das referidas etapas, está fortemente relacionada ao número de estágios envolvidos, já que o tempo de processamento cresce contrapondo-se ao seu rendimento, que decresce com o aumento do número de estágios. Sendo assim, há a necessidade de se estabelecer técnicas eficientes e competitivas, de modo a tornar o processo biotecnológico viável economicamente (SINGH, P. C.; SINGH, 1996).

É importante levar em consideração quando houver a necessidade de se separar determinado produto de uma solução, alguns critérios para a escolha do processo de separação, baseado nas diferentes propriedades físico-químicas ou bioquímicas, escolhendo o processo pelo qual irá se explorar as diferenças destas propriedades entre o produto e impurezas de maneira mais eficiente (SCHMIDELL et al., 2001; ASENJO, 1990; BORZANI et al., 2001;).

A fisiologia microbiana indicará não apenas a geração como também a localização do produto. Se o mesmo for secretado, as etapas de recuperação seguem um roteiro diferente da recuperação do produto intracelular. Além da

localização do produto (intracelular ou extracelular), influenciam também na escolha do método de separação e purificação outras características, como o tamanho molecular, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade e de outras propriedades físico-químicas do meio de fermentação, como viscosidade, densidade, impurezas e partículas indesejáveis. A opção pelas operações de separação será influenciada ainda pelo tamanho do próprio bioprocessos e do valor do produto. Os arranjos deverão ser em série a fim de se atingir o grau de pureza requerida (ex. extratos enzimáticos brutos ou enzima purificada) e a forma final exigida para um dado produto (produto cristalizado, liofilizado, líquido concentrado, prensado) (SINGH, P. C.; SINGH, 1996; ASENJO, 1990).

Quadro 2 - Técnicas empregadas nas etapas de recuperação e purificação de bioprodutos.

Etapas do processo	Técnicas
Separação de células e fragmentos celulares	Filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação.
Rompimento de células	Homogeneização, moagem em moinho de bolas, rompimento químico ou enzimático com alta pressão.
Purificação de baixa resolução	Extração por solvente, precipitação e ultrafiltração.
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica, de afinidade, de fase reversa e de exclusão molecular.
Tratamentos finais	Cristalização, liofilização, secagem.

Fonte: adaptado de NORTE, 2007.

3.3.1 Separação de células e fragmentos celulares (Clarificação)

A separação de células suspensas de um meio de cultivo é geralmente a primeira operação unitária do processo de purificação. O meio resultante, isento de células, é denominado clarificado ou filtrado. Alguns exemplos de operações unitárias de clarificação, viáveis em escala industrial incluem filtração convencional e centrifugação. A filtração convencional aplica-se à clarificação de grandes volumes de suspensões diluídas de células, da ordem de milhares de litros, produtos extracelulares e situações nas quais a assepsia não é necessária. Consiste em direcionar a suspensão obtida a um meio filtrante. A fração volumétrica que atravessa este meio é denominada filtrado, e da contínua deposição das células sobre o meio filtrante, resulta a formação de um "torta de filtração". A escolha da membrana filtrante adequada está condicionada às características físico-químicas do material a ser filtrado e do processo global de purificação (ASENJO, 1990; BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

Já a centrifugação compreende a aceleração da sedimentação das células em suspensão em um meio líquido, por ação de um campo gravitacional centrífugo. Suspensões de células que não podem ser tratadas com auxiliares de filtração (por exemplo, quando o produto está associado às células), ou nas quais a assepsia deve ser preservada, podem ser clarificadas através da centrifugação. Da centrifugação resultam suspensões mais concentradas em relação à original, enquanto que a filtração dá origem a uma torta relativamente

seca, o que constitui vantagem desta última operação unitária em relação à centrifugação (ASENJO, 1990; BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

Embora os equipamentos de centrifugação sejam mais caros que os de filtração, a centrifugação normalmente é mais eficiente na separação de pequenas partículas, difíceis de filtrar. Células microbianas (bactérias e leveduras), por exemplo, podem ser separadas do meio líquido por centrifugação, enquanto na filtração elas causam severos problemas de entupimento dos filtros. Para produtos intracelulares, a centrifugação também é uma boa alternativa, visto que auxiliares de filtração não podem ser adicionados (ASENJO, 1990; BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

3.3.2. Rompimento de células

Após as etapas de separação e lavagem das células obtidas ao final do cultivo, é necessário proceder à lise celular, principalmente quando o produto de interesse são enzimas e produtos recombinantes intracelulares. A forma de realizar o rompimento celular depende do tipo de microrganismos empregado, devendo ainda considerar fatores como o tamanho da célula, tolerância e tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação, rendimento do processo, gasto de energia, custo e capital de investimento (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005; ABRAHÃO NETO, 2001).

Células envolvidas apenas por membranas celulares são frágeis e facilmente rompidas sob baixas tensões de cisalhamento ou por simples variação da pressão osmótica do

meio, adição de detergentes ou aplicação de ultra-som de baixa intensidade e requerem pouca energia para sua realização. Uma simples operação de bombeamento nessas células pode provocar perda da molécula alvo e isso se tornaria um problema no processamento do meio. Por outro lado, células com estruturas de parede robusta são de difícil rompimento (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005; ABRAHÃO NETO, 2001).

Os principais métodos de rompimento celular podem ser classificados como: mecânicos (homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, ultra-som), não mecânicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, secagem); químicos (álcalis, solventes, detergentes e ácidos) e enzimáticos (lise enzimática ou inibição da síntese da parede celular) (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005; ABRAHÃO NETO, 2001).

3.3.3 Purificação

Esta etapa do processo downstream pode ser dividida em duas fases: (1) isolamento primário (concentração ou purificação de baixa resolução), e (2) purificação propriamente dita (purificação de alta resolução). Na primeira fase, se dá a remoção de componentes com propriedades significativamente diferentes e a concentração do produto aumenta consideravelmente. As operações típicas envolvidas na purificação de baixa resolução incluem: extração por solvente, precipitação em meios aquosos e ultrafiltração.

Já na fase de purificação de alta resolução, ocorre a separação do produto de outros com propriedades

semelhantes, sendo mais seletiva do que a primeira. As principais operações envolvidas são as técnicas cromatográficas.

3.3.4. Precipitação em meios aquosos

De acordo com Schmidell e colaboradores (2001), a solubilização de proteínas precipitadas pode ser dimensionada de modo a promover a redução do volume inicial e, portanto, levar ao aumento da concentração, podendo preceder processos de elevada resolução, como por exemplo, a cromatografia.

Existem dois tipos de precipitação em meios aquosos: “salt-in” e “salt-out”. À precipitação de proteínas em altas concentrações salinas dá-se o nome de "salting-out". A adição de sais a concentrações de 1,5 a 3,0 M reduz a disponibilidade de água, devido à hidratação dos íons adicionados, e conseqüentemente reduzindo a disponibilidade de moléculas de água que circundam as zonas hidrófobas da superfície da proteína, criando-se condições para a precipitação, a qual ocorre principalmente por interação entre zonas hidrófobas de moléculas de proteína (SCHMIDELL et al., 2001). Os sais mais adequados são aqueles que apresentam elevada solubilidade, aumentam a tensão superficial do solvente, resultando menor nível de hidratação das zonas hidrófobas e, portanto, aumentam a probabilidade de interação entre estas zonas. Os mais empregados são citrato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de amônio (ABRAHÃO NETO, 2001).

Uma vantagem significativa do uso de solventes é a redução da densidade do meio líquido, o que favorece a sedimentação do precipitado, podendo-se eliminar inclusive a necessidade do uso de uma centrífuga. Na precipitação por ação de solventes, o parâmetro crítico na ampliação de escala do processo é o controle da transferência de calor. Perdas no rendimento e na qualidade final do produto são frequentemente verificadas. O processo do tipo contínuo pode apresentar vantagens no controle desses parâmetros, resultando um fracionamento mais preciso e redução de perdas por desnaturação (SCHMIDELL et al., 2001; ABRAHÃO NETO, 2001).

Já na precipitação por "salting-out", as características do precipitado são o fator fundamental para a adequada ampliação de escala do processo. Nesse caso, manter constante a potência transmitida por unidade de volume durante a agitação e o tempo do processo, é recomendável. O objetivo é não modificar a tensão de cisalhamento imposta, de modo a obter agregados de precipitados de densidade e tamanho constantes. Fatores como a concentração do agente de precipitação, pH e temperatura do processo, obviamente são mantidos constantes na ampliação da escala do processo (SCHMIDELL et al., 2001; ABRAHÃO NETO, 2001).

3.3.5. Ultrafiltração

A ultrafiltração consiste no transporte de soluções através de membranas com poros de diâmetros de 0,001 a 0,1 µm, sob pressão, e é bastante aplicada quando se deseja concentrar macromoléculas como proteínas ou

polissacarídeos. Os tamanhos dos poros das membranas de ultrafiltração não são uniformes e apresentam uma distribuição normal ao redor do tamanho médio do poro. A faixa dessa distribuição varia de acordo com o método de fabricação da membrana e, também, entre fabricantes. Por isto, o diâmetro dos poros da membrana a ser utilizada deve ser 20% menor que a massa molecular da proteína alvos (SCHMIDELL et al., 2001).

3.3.6. Extração em sistema de duas fases

A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis, constituídas de uma fase aquosa e um solvente, é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos (BELTER; CUSSLER; HU, 1988). Para algumas proteínas e biomoléculas, no entanto, tais sistemas não são adequados devido à sensibilidade desses componentes à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos. Uma das principais vantagens do sistema aquoso bifásico é justamente o ambiente aquoso, que oferece condições adequadas à distribuição das biomoléculas, tais como as proteínas, nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e consequente perda de atividade biológica (PIGNATA, 2014).

A extração em sistema de duas fases tem sido aplicada à purificação de produtos obtidos em células animais, vegetais e microbianas, na separação de vírus, organelas e ácidos nucleicos. São fatores decisivos as propriedades superficiais das proteínas, como carga elétrica e

hidrofobicidade, além da massa molecular (SCHMIDELL et al., 2001).

3.3.7. Processos cromatográficos

Pelas diferentes propriedades das proteínas, as técnicas cromatográficas se diversificam para propiciar a separação de misturas proteicas. Geralmente, recomenda-se o uso de uma combinação de técnicas que empreguem diferentes princípios de separação, de modo que, a cada estágio do processo, sejam removidos contaminantes com propriedades diversas (NORTE, 2007; SCHMIDELL et al., 2001). O Quadro 3 indica quais os tipos de cromatografia podem ser empregados, de acordo com as propriedades das proteínas envolvidas no processo de purificação .

Quadro 3 - Propriedades proteicas exploradas na separação e respectivas técnicas cromatográficas

Técnica	Princípio de separação
Interação Hidrofóbica e Fase Reversa	Diferenças de hidrofobicidade superficial de proteínas em uma mistura
Afinidade	Interações bioespecíficas (ex: antígeno/anticorpo) entre proteína em solução e ligante na fase sólida
Exclusão Molecular ou Filtração em Gel	Diferença de tamanho das proteínas e capacidade das mesmas de penetrar ou não nos poros da fase sólida, alongando ou não seu caminho através do leito de fase sólida.
Troca Iônica	Diferenças de carga elétrica superficial de proteínas em uma mistura.

Fonte: NORTE, 2007.

3.3.8. Tratamentos finais

A etapa de purificação é necessária para grande parte dos produtos biotecnológicos, especialmente aqueles de uso farmacêutico. Nesse caso os produtos devem estar puros, secos, cristalinos ou amorfos. Para tanto, devem ser submetidos a alguns tratamentos finais como a cristalização ou a liofilização. Os materiais liofilizados são apresentados na forma de pó e as atividades biológicas se mantêm estáveis por muito mais tempo, quando comparadas com a conservação em solução aquosa. Devido a este fato, muitas proteínas encontram-se no mercado em sua forma liofilizada. No entanto, se a liofilização não for adequadamente planejada, o processo pode ocasionar a desnaturação das enzimas e comprometimento do produto final (BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

Outra técnica comumente empregada na fase final dos processos de purificação de proteínas, particularmente as enzimas é a cristalização. Consiste no processo de agregação de cristais de moléculas presentes em soluções homogêneas supersaturadas. A cristalização é de grande importância em processos biotecnológicos, uma vez que permite a estocagem estável de bioprodutos. Na etapa final de purificação de enzimas, estas devem estar em um grau relativamente alto de pureza, pois a cristalização pode ocorrer em misturas impuras de proteínas. Após a cristalização, o produto pode ser recuperado por filtração ou centrifugação seguido de secagem (BELTER; CUSSLER; HU, 1988; SCHMIDELL et al., 2001).

3.4 Principais dificuldades nos processos biotecnológicos

Com base na abordagem realizada neste trabalho sobre as etapas dos processos biotecnológicos, o Quadro 4 resume os principais desafios encontrados nestas fases, quando as etapas do processo não são devidamente planejadas.

Processos upstream	
Causas	Consequências
Seleção incorreta do microrganismo biocatalisador	Redução da atividade da enzima de interesse por ação de outras proteases produzidas pelo microrganismo
	Oscilações na manutenção da produção da substância de interesse ao longo das etapas do processo
	Aumento do custo do processo devido aos riscos ambientais causados por microrganismos patogênicos
	Aumento do custo do processo devido à complexidade das condições de crescimento exigidas
	Redução do rendimento do produto final devido à dificuldade de separação deste das células do agente biológico
Má conservação das cepas	Perda das características genuínas do microrganismo
Meio de cultura	Variações drásticas de pH ou formação excessiva de espuma devido a ausência de tamponamento do meio

inadequado	Dificuldade na conversão do substrato em produto por déficit de nutrientes exigidos pelo agente biológico, com consequente diminuição do rendimento do processo.
Esterilização inadequada do meio de cultura	Produção de substâncias por microrganismos contaminantes que possam inibir o microrganismo de interesse, competir com estes pelos nutrientes do meio ou produzir enzimas que decomponham o produto final
	Comprometimento do processo como um todo, devido à escolha do método incorreto de esterilização
	Decomposição dos nutrientes do meio devido a manutenção de temperaturas muito elevadas (no caso da esterilização descontínua)
	Elevados consumos de vapor (no aquecimento) e de água (no resfriamento), resultantes da eficiência relativamente baixa do sistema de troca de calor (no caso de esterilização descontínua)
Esterilização inadequada do ar	Falha no processo de esterilização pela temperatura menor que a requerida
	Contaminação devido à escolha de sistema centralizado de esterilização, seguido da distribuição do ar para os vários reatores
Bioprocesso	
Escolha incorreta da forma de condução do processo	Inibição do agente biológico devido às elevadas concentrações de substrato, causando lise celular (no caso do tipo batelada simples).
Controle em processo	

Temperatura fora da faixa ótima	Comprometimento do rendimento de conversão do substrato em proteínas enzimáticas
Pressão fora do especificado	Favorecimento de contaminação nos biorreatores – comprometimento da assepsia (quando aplicável)
Agitação insuficiente	Deficiência do fornecimento de oxigênio, com comprometimento da atividade respiratória celular
Agitação excessiva	Elevação do índice de formação de espuma, causando o bloqueio de linhas e filtro de exaustão
pH fora da faixa ótima	Comprometimento da estrutura e permeabilidade célula
Processos downstream	
Separação de células e fragmentos celulares	Algumas células microbianas podem causar severos problemas de entupimento dos filtros quando utilizado o sistema de filtração.
Rompimento de células	Perda da molécula alvo ou ineficiência do rompimento celular
Dificuldades nas etapas de purificação	Modificação irreversível da conformação estrutural ou desnaturação da proteína de interesse e perda do produto final durante a etapa de precipitação em meio aquoso
	Desnaturação da proteína quando se trabalha com altas temperaturas na etapa de precipitação em meio aquoso
	Redução no rendimento do produto purificado quando não se escolhe a técnica cromatográfica compatível com o produto de interesse

Falha nos processos de tratamentos finais	Desnaturação das enzimas e comprometimento do produto final de interesse, quando os processos de liofilização e cristalização não são bem planejados e executados
--	---

Fonte: LUNA, 2016

4. CONCLUSÃO

Para que os bioprocessos possam despertar o interesse tecnológico e comercial, seja na criação de um processo novo ou na otimização de um já existente, é essencial entender os fatores tecnológicos que afetam significativamente a sua competitividade. Dessa forma, torna-se possível definir os parâmetros mais adequados para o desenvolvimento do bioprocessos de interesse. O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito da correta definição dos seguintes pontos básicos relacionados às condições para seu desenvolvimento: microrganismo, meio de cultura, forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto.

Foi possível observar que inúmeras dificuldades podem surgir em virtude do mau planejamento e execução das técnicas envolvidas nas etapas dos processos biotecnológicos convencionais, dificuldades estas que certamente irão comprometer a obtenção ou o rendimento do produto final. Entre estas, podem ser citadas as seguintes: redução da atividade enzimática, em virtude da seleção incorreta do microrganismo biocatalisador, ou do emprego do meio de cultura nutricionalmente inadequado, ou mesmo devido à

incorreta condução do processo; redução do rendimento do produto de interesse, ou até mesmo sua perda, como resultado da utilização de um meio de cultura inadequado, ou da dificuldade de separação e purificação das moléculas alvo, ou problemas com a monitorização das condições da reação; problemas de esterilidade e segurança dos processos fermentativos; e aumento dos custos devido à complexidade das técnicas aplicadas.

Tendo em vista que o rendimento do produto final do bioprocessamento depende estritamente do planejamento correto das técnicas aplicadas, pode-se afirmar que este delineamento contribui substancialmente para os custos totais da obtenção de uma biomolécula. Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de técnicas mais econômicas e simplificadas de acordo com o objetivo final desejado devem ser avaliados antes da definição do bioprocessamento de interesse.

5. REFERÊNCIAS

ABRAHÃO NETO, J. Purificação de Enzimas. In: Biotecnologia Industrial Vol 3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. Eds. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 2001.

ASENJO, A. J. Separation process in biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1990.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Inc., New York, 1996.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology. Nova York: John Wiley & Sons, 1988.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord). Fundamentos. Biotecnologia Industrial. v. 1. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering, 76 (3): 291-302, 2006.

DONDOS, A. Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins. J. Chromatogr. A, Volume 1127, Issue 1-2, 15, p. 183- 186, 2006.

HAGE, D. S. High-performance affinity chromatography: A powerful tool for studying serum protein binding. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Volume 768, Issue1, p. 3-30, . 2002.

HAHN, R.; DEINHOFER, K.; MACHOLD, C.; JUNGBAUER, A. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: II. Binding capacity,

recovery and mass transfer properties. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Volume 790, Issue 1-2, p. 99-114, 2003.

KLEINSTREUR, C. Analysis of biological reactors. In: BUNGA Y, H.R.; BELFORT, G. *Advanced Biochemical Engineering*, Nova York, John Wiley & Sons, Inc., cap.3, p.33-78, 1987.

LAMBERT, P. W.; MEERS, J. L. The Production of Industrial Enzymes. *Phil. Trans. Soc. Lond. B* 300: 263-282, 1983.

MARX, J. L. *A Revolution in Biotechnology*. New York: Cambridge University Press, 1989.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, M.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New Developments in Solid State fermentation II. Rational Approaches to the Design Operation and Scale-up of Biorreactors. *Process Biochemistry*, 35, 1211-1225, 2000.

NORTE, L. C. Avaliação da utilização de membranas troca-iônica na purificação de eritropoetina humana recombinante. Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, CICT / FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. A. New Developments in Solid State fermentation I. Bioprocess and Bioproducts. *Process Biochemistry*, 35, 1135-1169, 2000.

PARIS, R. G.; SCHMIDELL, W.; BORZANI, W. Destruction of airborne microorganisms by the heat generated during air compression. *Biotechn. Tech.*, vol.1, n.2, p.141-2, 1987.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. *Tecnologia de bioprocessos*, v. 1. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. 1ed. Barueri: Ed Manole, 2005.

PIGNATA, M. C. Estudo do equilíbrio de fases e partição da α -lactoalbumina e lisozima em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água. *Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos*, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, 2014. 64f.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology*. 5th edition. New York: The McGraw-Hill, 2002, p. 992 – 1009.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N.G. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127-135, 2003.

ROBERTSON, J. H.; FRIEBÊN, W. R. Microbial validation of vent filters. *Biotechnol. and Bioeng.*, vol. 26, n.8, p.828-35, 1984.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. v. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

SCOPES, R. K. *Protein purification. Principles and practice*. 3.ed. Nova York: Springer-Verlag, 1994.

SINGH, P. C.; SINGH, R. K. Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends in Food Science and Technology*, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 49-58, 1996

STANBURY, P.F.; WHÍTAKER, A.; HALL, S.J. *Principies of fermentation Technology*. 2.ed. Reino Unido: Elsevier Science Ltd., 1995.