Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLÓGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CLEYTON LAGE ANDRADE

Análise de Risco em Metodologia Analítica de Controle de Qualidade do Biofármaco Alfainterferona 2b

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Rio de Janeiro
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

A553 Andrade, Cleyton Lage

Análise de risco em metodologia analítica de controle de qualidade do biofármaco Alfainterferona 2b / Cleyton Lage Andrade. – Rio de Janeiro, 2013.
xvi,110 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.

Bibliografia: f. 85-93.

1. Controle de qualidade. 2. Alfainterferona 2b. 3. Gestão de risco para qualidade. 4. HACCP. 5. Quantificação de DNA. I. Título.

CDD 615.37

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Departamento de Controle de Qualidade – DEQUA, sob a orientação da Dra. Elezer Monte Blanco Lemes.

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLÓGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CLEYTON LAGE ANDRADE

Análise de Risco em Metodologia Analítica de Controle de Qualidade do Biofármaco Alfainterferona 2b

Orientadora: Dra. Elezer Monte Blanco Lemes

Dissertação apresentada em 06 de março de 2013.

Examinadores:

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna
Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos Bio-Manguinhos (Fiocruz)

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Damião Carlos Moraes dos Santos
Universidade Gama Filho (UGF)

Rio de Janeiro
2013

À minha família em Belo Horizonte
que mesmo longe me dão muita força,
carinho, amor e iluminam minha vida.

Aos amigos (*in memoriam*) Orlando e
Professor Armando pelos ensinamentos,
amizade e carinho.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

- À Fiocruz pela oportunidade da realização do mestrado e apoio financeiro.
- Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos pela possibilidade de realização deste trabalho e condições fornecidas e à direção do MPTI nas pessoas das Dra. Sheila e Zaíra pela atenção, empenho, ajuda e conselhos.
- Meu Deus, meu Jesus e meu São Jorge, a cada dia que ouviam minhas preces aliviaram a saudade de casa, me deram força e coragem para continuar a enfrentar esse meu novo caminho. Obrigado a vós.
- Doutora Elezer Monte Blanco Lemes pelo interesse, motivação, apoio, atenção, orientação e ensinamentos para que esse trabalho pudesse ganhar vida e por me encorajar a enfrentá-lo sem medo.
- Aos amigos do mestrado que nas horas ruins e boas estavam sempre juntos, em especial à Ingrid Medeiros e Michel Gomes que passaram mais dois anos de penação juntos; ao Dênis Millan, Lívia Rubatino e Aline Martins pelo apoio direto nas horas de receio e dúvidas sobre o novo assunto para mim e aqueles que de certa forma me ajudaram na realização do trabalho.
- Ao DEQUA na pessoa da Darcy Akemi Hokama pela atenção inicial e possibilidade da realização do trabalho no departamento.
- Daniel Guedes que primeiramente se propôs a me orientar, contudo mesmo não sendo possível a continuação foi de grande auxílio e sempre prestativo.
- Marisa Ribeiro, Érica Fonseca, Joyce Brito e Gisela Freitas pela atenção e por estarem sempre disponíveis e prestativos a esclarecer dúvidas.
- Professor José Procópio pelas contribuições para finalização deste trabalho.
- Aos amigos de Fundão pelos momentos de curtição, alegria, descontração e brincadeiras.
- À minha família do Rio de Janeiro Samuel Toledo, Carlos Gustavo Azevedo e Tatiana Oliveira.

Agradeço do fundo do coração a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii
LISTA DE QUADROS xii
LISTA DE TABELAS xii
LISTA DE FIGURAS xiii
RESUMO xv
ABSTRACT xvi
1 - INTRODUÇÃO 2
1.1- Histórico Geral 2
1.2 – Alfainterferona em Bio-Manguinhos 3
1.3 – Interferons 5
1.4 – Alfainterferona 2b 7
1.5 - Controle de Qualidade 8
1.5.1 Métodos Analíticos 10
1.5.2 Garantia de Qualidade Analítica 12
1.6 - Validação dos ensaios analíticos 14
1.6.1 Precisão e reprodutibilidade. 15
1.6.2 Exatidão 16
1.6.3 Equivalência analítica 17
1.7 - Ensaios radioativos de controle de qualidade 17
1.8 - Métodos Analíticos Farmacopeicos 19
1.9 - Detecção de Traços de DNA 22
1.10 - Ensaios para Quantificação de DNA Residual de Células Hospedeiras (DCH) 24
1.10.1. Hibridização 24
1.10.2 PCR em tempo real ou PCR quantitativo 26
1.10.3 *Threshold* 28
1.11 - Gestão de Risco para a Qualidade 30
1.11.1 Design Space 36
1.11.3 HACCP 41
1.12 – Relevância do estudo 43
2 – OBJETIVOS 45
2.1 - Objetivo Geral 45
2.2 - Objetivos específicos 45

3 – METODOLOGIA 46
3.1 – 1ª fase: Levantamento bibliográfico 47
3.2 – 2ª fase: Desenho de fluxogramas 48
3.3 – 3ª fase: Desenho de diagramas de causa e efeito 48
3.4 – 4ª fase: implementação do HACCP 48
3.5 – 5ª fase: elencar PCC 48
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
4.1 – Fluxogramas 51
4.2 – Diagrama de causa e efeito (Ishikawa ou espinha de peixe) 63
4.3 – Implementação do HACCP 66
4.3.1 – Tabelas de perigos, causas e efeitos. 66
4.3.2 – Pontos críticos de controle (PCC) 71
4.4 – Ensaios alternativos para quantificação de DCH 75
5 – CONCLUSÃO 83
5.1 – Perspectivas e trabalhos futuros 84
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{32}P – Isótopo radioativo Fósforo 32

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – *Adenosine Triphosphate* (Adenosina Trifosfato)

BPF – Boas Práticas de Fabricação

BPL – Boas Práticas Laboratoriais

CBP/p300 – *CREB-Binding Protein* (Proteína de Ligação à CREB)

CEE – Comissão de Estudo Especial de Gestão de Risco

CGLAB – Coordenação Geral de Laboratórios

CGPNI – Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações

CGSH – Coordenação Geral Sangue e Hemoderivados

CHO – Chinese Hamster Ovary (Ovário de Hamster Chinês)

CIGB – *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia)

CIM – *Centro de Inmunología Molecular* (Centro de Imunologia Molecular)

CIPBR – Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos

CPP – *Critical Process Parameters* (Parâmetros Críticos do Processo)

CQA – *Critical Quality Attributes* (Atributos Críticos de Qualidade)

CREB – *cAMP-Response Element-Binding* (Elemento de Ligação à Resposta de cAMP)

DCB – Denominação Comum Brasileira

DCH – DNA de células hospedeiras

DEQUA – Departamento de Controle de Qualidade

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DOE – *Design of Experiments* (Planejamento de Experimentos)

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

DTP – Difteria Tétano Coqueluche

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Acetato Etilenodiamino Tetracético)

EFPIA – *European Federation of Pharmaceutical Industries Associations* (Federação Européia das Associações das Indústrias Farmacêuticas)

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunosorbente Ligado à Enzima)

EMA – European Medicines Agency (Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos)

EPO– Eritropoetina

EU – União Européia

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMEA – *Failure Mode, Effects Analysis* (Análise de Modo e Efeitos de Falha)

FMECA – *Failure Mode, Effects and Criticality Analysis* (Análise da Criticidade de Modo e Efeitos de Falha)

fsDNA – DNA fita simples

FTA – *Fault Tree Analysis* (Análise da Árvore de Falhas)

FUNASA – Fundação Nacional da Saúde

GMP – *Good Manufacturing Practice* (Boas Práticas de Fabricação)

GQA – Garantia da Qualidade Analítica

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle)

HAZOP – *Hazard Operability Analysis* (Análise de Perigos de Operabilidade)

HCC – Hepatite C Crônica

HCV – Vírus da Hepatite C

HIB – *Haemophilus influenza* B

HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

ICH – *International Conference on Harmonisation* (Conferência Internacional de Harmonização)

IEC – *International Engineering Consortium* (Consócio Internacional de Engenharia)

IFA – Ingrediente Farmacêutico Ativo

IFN – Interferon

IFNα – Interferon α

IFNα-2b – Interferon Alfa 2b

IFN-β – Interferon β

IKK-ε – *Inhibitor-κB kinase ε* (proteína Quinase ε Inibidora de κB)

ILA – Imuno-Ligand Assay (Ensaio Imuno-Ligante)

IMA – *Institute of Management Accountants* (Instituto de Gestão de Contadores)

IPS-1 – *Interferon Promoter Stimulator 1*(Estimulador Promotor de Interferon 1)

IRF-3 – *Interferon Regulatory Factor 3* (Fator Regulador de Interferon 3)

IRF-7 – *Interferon Regulatory Factor 7* (Fator Regulador de Interferon 7)

IRF-9 – *Interferon Regulatory Factor 9* (Fator Regulador de Interferon 9)

ISG – *Interferon Stimulated Genes* (Genes Estimuladores de Interferon)

ISGF3 – *Interferon-Stimulated Genes Factor 3* (Genes Estimuladores de Interferon Fator 3)

ISO – *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

ISRE – *Interferon-Sensitive Response Element* (Elemento de Resposta Sensitivo à Interferon)

Jak – *Janus kinase* (Janus Quinase)

LAPS – Light-Addressable Potentiometric Sensor (Sensor Potenciométrico Endereçador de Luz)

Mhw – *Ministry of Health and Welfare* (Ministério da Saúde e Bem-Estar)

NS3 –*Nonstructural Protein 3* (proteína Não Estrutural 3)

NS4A – *Nonstructural Protein 4A* (proteína Não Estrutural 4A)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMP – *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Padrão Molecular Associado à Patógeno)

PC – Pontos de Controle

PCC – Pontos Críticos de Controle

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Peg-INF – Interferon Peguilado

PHA – *Preliminary Harzard Analysis* (Análise Preliminar de Perigos)

PhRMA – *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* (Pesquisa e Fabricantes Farmacêuticos da América)

PNI – Programa Nacional de Imunizações

POP – Procedimento Operacional Padrão

PRD – Domínio Regulatório Positivo de DNA

PVDC – *Polyvinylidene Chloride* (Cloreto de Polivinilideno)

qPCR – quantitative PCR (PCR quantitativo)

RCC – Carcinoma de Célula Renal

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

RIG-I – *Retinoic acid Inducible Gene I* (Gene Indutor de Ácido Retinóico)

RNA – Ácido Ribonucléico

RVS – Resposta Virológica Sustentada

SCTIE – Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SQ – Sistema da Qualidade

SSB – Single-Stranded Binding protein (proteína Ligadora de Fita Simples)

SSC – *Standard Saline Citrate* (Citrato Salina Padrão)

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription* (Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição)

STAT1 – *Signal Transducer and Activator of Transcription type 1* (Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição Tipo 1)

STAT2 – *Signal Transducer and Activator of Transcription type 2* (Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição Tipo 2)

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

TBE – Tris Borato EDTA

TBK1 – *TANK-binding kinase* 1

TQM – *Total Quality Management* (Gestão da Qualidade Total)

Tyk2 – *Tyrosine kinase 2* (Tirosina Quinase 2)

USP – *United States Pharmacopeia* (Farmacopeia Americana)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....14

Quadro 1.2: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....15

Quadro 1.3: Metodologias mais comuns de análise de risco.....39

Quadro 3.1**:** Resumo dos pontos críticos de controle (PCC) para cada ensaio avaliado.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Definições associadas à Garantia de Qualidade Analítica.....13

Tabela 1.2: Usos principais de sondas de ácidos nucléicos radiomarcadas *in vitro*.....20

Tabela 4.1: Perigos, suas causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação para o ensaio de Dot Blot radioativo.....67

Tabela 4.2: Perigos, suas causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação para o ensaio de qPCR.....68

Tabela 4.3: Perigos, suas causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação para o ensaio de *Threshold*.....69

Tabela 4.4: Determinação dos PCCs no ensaio de Dot Blot radioativo.....71

Tabela 4.5: Determinação dos PCCs no ensaio de qPCR.....72

Tabela 4.6: Determinação dos PCCs no ensaio de *Threshold*.....73

Tabela 4.7: Características de desempenho dos métodos de quantificação de DCH.....77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ação do IFN na infecção por HCV.....5

Figura 1.2: Linha do tempo para evolução do processo de qualidade e BPF.....9

Figura 1.3: O processo de hibridização.....25

Figura 1.4: Ensaio Dot-Blot de hibridização para a quantificação do DNA genômico residual de *E. coli*.....26

Figura 1.5: Diagrama detalhando os estágios do processo de qPCR.....27

Figura 1.6: Esquema dos estágios do ensaio de DNA Total no sistema *Threshold*.....29

Figura 1.7: Estágios do ensaio *Threshold*.....30

Figura 1.8: Carteira industrial de riscos.....30

Figura 1.9: Visão geral de um típico processo de gestão de risco para qualidade.....33

Figura 1.10: Representação esquemática da interação entre gestão, comunicação e avaliação de riscos.....34

Figura 1.11: Ligação entre Espaço de Conhecimento, *Design Space* e Faixa Normal de Operação.....38

Figura 4.1: Árvore de perguntas para determinação dos PCC.....50

Figura 4.1: Fluxograma do ensaio de dot-blot radioativo.....53

Figura 4.2: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa de extração de DNA.....54

Figura 4.3: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa de preparo do mix master da reação.....55

Figura 4.4: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa do preparo da curva padrão.....56

Figura 4.5: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa das diluições seriadas.....57

Figura 4.6: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa do PCR em tempo real.....58

Figura 4.7: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa de extração de DNA.....59

Figura 4.8: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da espectrofotometria.....60

Figura 4.9: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da eletroforese.....61

Figura 4.10: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da quantificação de DNA.....62

Figura 4.11: Diagrama de causa e efeito das possíveis fontes de variação nos ensaios de quantificação de DNA de célula hospedeira (DCH).....64

Figura 4.12: Ilustração indicativa das fontes típicas de incertezas.....66

Figura 4.13: Representação esquemática do alcance dinâmico dos métodos de quantificação de DNA.....76

Figura 4.14: Gráfico representativo da importância dos fatores que influenciam na escolha de uma metodologia analítica para quantificação de DCH.....81

RESUMO

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos é uma unidade de produção da Fundação Oswaldo Cruz ligado ao Ministério da Saúde. Em 2004 realizaram-se acordos com o *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) para a produção do biofármaco Alfainterferona 2b (IFNα-2b) para suprir a demanda do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde. Assim, a produção e distribuição deste biofármaco garante à população o acesso gratuito aos produtos de alta tecnologia, fortalecendo os princípios de universalidade, integralidade e equidade que norteiam as ações do Sistema Único de Saúde. A análise de produtos biotecnológicos baseia-se no uso de métodos analíticos sofisticados para demonstrar sua identidade estrutural, homogeneidade de proteínas e avaliar sua vida útil ou estabilidade. Embora não haja relatos de efeitos adversos para a saúde pelo DNA do hospedeiro no produto intermediário de produtos biotecnológicos, as agências regulatórias tem requerido às indústrias a garantia de que o nível de DNA neles seja bem reduzido. A técnica comumente utilizada pelo CIGB para quantificar níveis de DNA é a hibridização radioativa. No entanto, vários fatores tornam impraticável seu uso na rotina dos laboratórios analíticos: é trabalhoso, demorado, semi-quantitativo e requer um radioisótopo. Para determinar essas pequenas quantidades de DNA, um método analítico deve ser extremamente sensível e robusto. Em princípio, três técnicas têm a sensibilidade requerida: a hibridização, os métodos baseados em ligação de DNA e proteína (como o *Threshold*) e o PCR quantitativo. A Gestão de Riscos para Qualidade (GRQ) é um processo sistemático para avaliação, controle, comunicação e análise de riscos para a qualidade do produto (medicamento) em todo seu ciclo de vida. O gerenciamento de riscos auxilia na decisão, levando em consideração as incertezas, a possibilidade de circunstâncias ou eventos futuros e seus efeitos sobre os objetivos acordados. A GRQ apoia uma abordagem científica e prática para a tomada de decisões e podem avaliar e gerenciar riscos utilizando ferramentas próprias. Neste trabalho, nossa proposta foi estabelecer uma metodologia alternativa para o controle de qualidade do biofármaco IFNα-2b utilizando como metodologia a ferramenta de análise de risco, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Foram observados 25 perigos para o dot-blot nas oito etapas do ensaio, 14 perigos nas cinco etapas do qPCR e 19 perigos nas cinco etapas do *Threshold*. Vários desses perigos, nos respectivos ensaios, apresentam causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação semelhantes. Verificou-se que o e dot-blot radioativo é o ensaio que apresenta maior número de pontos críticos de controle (PCC) devido a sua natureza radiativa, 16 no total. Logo após vem o qPCR com seis PCC em três etapas seguido do *Threshold* com cinco PCC estando quatro em uma única etapa, o que evidencia que a alta criticidade da etapa e que muitas medidas de mitigação precisam ser implementadas para que o ensaio esteja dentro dos padrões de controle de uso na rotina dos laboratórios. Conclui-se a partir da análise dos perigos pelo uso do HACCP que a metodologia analítica alternativa melhor avaliada para a questão proposta é o qPCR.

ABSTRACT

The Immunobiological Technology Institute Bio-Manguinhos is a production unit of Oswaldo Cruz Foundation attached to the Ministry of Health, committed to improving the health of the population, so in 2004 took place agreements with the *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) for IFNα 2b (IFNα-2b) production to supply the demand of the Ministry of Health Special Medication Program. Therefore, the production and distribution of that biopharmaceutical guarantees to the population free access to high technology products, strengthening the principles of universality, comprehensiveness and fairness that guide the actions of the Unified Health System. The analysis of biotechnology products relies on the use of sophisticated analytical methods to establish the identity, homogeneity of structural proteins and evaluate the useful life or the stability of it. Although there isn´t reports of adverse health effects for their content of host-DNA, regulatory agencies have required to the industries to ensure the low level of DNA in these products. The technique commonly used by CIGB to quantify DNA level is a radioactive-hybridization. However, several factors make it impractical for use in routine test for DNA contaminants: it is labor intensive, time consuming, semi-quantitative and requires a radioisotope. To determine these small amounts of DNA, an analytical method has to be extremely sensitive and robust. In principle, three techniques have the sensitivity required: hybridization, DNA binding protein-based methods (such as the *Threshold*) and quantitative PCR. Quality Risk Management (QRM) is a systematic process to assess, control, communicate and review of risks to verify the quality of the product (drug) throughout its life cycle. The process of risk management helps to make decision, considering the uncertainties and the possibility of future events or circumstances (intentional or unintentional) and their effects on the agreed objectives. QRM supports a scientific and practicing approach to make a decision and can assess and manage risk using self-tools. In this study, our proposition was to establish an alternative methodology for quality control of the biopharmaceutical IFNα-2b using the risk analysis tool Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) as methodology. There were 25 hazards to the dot-blot assay in eight steps of it, 14 hazards in five steps of qPCR and 19 hazards in all five stages of the *Threshold*. Moreover, even different, many of these hazards in their respective testing, exhibit the sames causes, effects, detection and mitigation measures. It was found that e radioactive dot-blot assay is the one with the greatest number of critical control points (CCP) due to its radioactive nature, 12 in total. After it comes qPCR with six CCP in three steps followed by *Threshold* with five CCP which four appears in one step, which demonstrates the high criticality of the step and because this many mitigation measures need to be implemented so that the test is within the standards control use in routine laboratories. We conclude from the analysis of hazards by the use of the HACCP alternative analytical methodology to better evaluate the issue is the proposed qPCR.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Histórico Geral

O Instituto Soroterápico Federal – que deu origem à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – foi fundado em 1900 para produzir vacinas com o objetivo de enfrentar a epidemia de peste bubônica que assolava o Brasil na virada do século. Em 1976, a Fiocruz criou uma unidade voltada especialmente para produção de imunobiológicos, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos , que atualmente responde por cerca de um terço das vacinas consumidas no Brasil. Junto com outros laboratórios públicos brasileiros, Bio-Manguinhos abastece o Sistema Único de Saúde com os imunobiológicos do Programa Nacional de Imunizações (PNI) (Bio-Manguinhos, 2010).

Bio-Manguinhos atende prioritariamente ao mercado público representado pelos seguintes órgãos do Ministério da Saúde (MS): Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) responsável pela aquisição de vacinas por meio da Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI), de reativos para diagnóstico laboratorial por meio da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) e do Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais (DST/AIDS); Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos (SCTIE) responsável pela aquisição de alguns biofármacos do Programa de Medicamentos Excepcionais do MS. A partir de 2010, Bio-Manguinhos passou a atender também à demanda da Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) por meio da aquisição pela Coordenação Geral Sangue e Hemoderivados (CGSH) do Teste NAT para HIV/HCV para triagem de bolsas de sangue. As atividades de Bio-Manguinhos além de garantirem o não desabastecimento de Programas do MS, também servem como um importante instrumento de política pública visando à redução de preços e ampliação do acesso à população.

Em todas as linhas de produtos, os principais fatores de diferenciação de Bio-Manguinhos são: a qualidade assegurada dos produtos conforme os requisitos necessários ao atendimento das demandas de saúde pública do país; o alinhamento às políticas públicas na área da saúde, e às políticas de desenvolvimento industrial e tecnológico. Estes fatores conferem ao Instituto papel estratégico em uma indústria altamente sensível à dinâmica de competição privada (Bio-Manguinhos, 2010).

Diversificando mais uma vez sua linha produtiva, Bio-Manguinhos assumiu um novo desafio tecnológico para atender à demanda do Ministério da Saúde, com relação a medicamentos de uso contínuo de alto valor agregado para pacientes: a produção de biofármacos. Este novo mercado, diferente dos imunopreveníveis, proporcionou dois acordos de transferência de tecnologia assinados em agosto de 2004: um com o CIMAB - empresa comercializadora dos produtos do *Centro de Inmunología Molecular* (CIM) em Havana, Cuba - para a produção nacional do biofármaco Eritropoetina (EPO), e outro com a Heber Biotec - empresa comercializadora dos produtos do *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) Havana, Cuba - para a produção nacional do biofármaco Alfainterferona 2b (IFNα-2b) (Bionotícias-2004). Estes dois biofármacos estão tendo sua produção nacionalizada e realizadas no CIPBR (Centro Integrado de Protótipos, Biofármacos e Reativos), com duas plataformas de produção distintas: uma em célula de mamífero (CHO – Célula do Ovário de Hamster), e outra em célula de bactéria (*E. coli*). Ambas plataformas irão trabalhar com células geneticamente modificadas. Estas novas tecnologias trazem como desafio para o Controle de Qualidade, novos equipamentos e metodologias de análise mais acuradas que possam responder a tempo e à hora as demandas da produção e, desta forma, assegurar produtos com qualidade, eficácia e segurança.

Para atender às necessidades da saúde da população brasileira, Bio-Manguinhos investe no desenvolvimento e produção de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos de qualidade assegurada. O cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) assim como a certificação de qualidade de seus laboratórios, faz do Instituto um importante agente para a melhoria da saúde pública do país. Sendo assim, o compromisso de Bio-Manguinhos é, por meio da melhoria contínua, desenvolver e produzir vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos dentro dos padrões da qualidade, motivando permanentemente seus colaboradores para atender às expectativas de seus clientes, atuando com responsabilidade social e atentando para a preservação do meio ambiente (Bio-Manguinhos, 2010).

1.2 – Alfainterferona em Bio-Manguinhos

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, comprometida com a melhoria das condições de saúde da população brasileira. Ao longo de sua existência a referida Instituição tem investido em desenvolvimento próprio, colaborações – a partir de processos de alianças estratégicas e transferência de tecnologia – e apoio a projetos que visem soluções para

prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças de grande impacto na saúde pública do país (Bio-Manguinhos, 2010).

No que se refere ao processo de transferência de tecnologia, Bio-Manguinhos tem realizado vários acordos com diversas instituições para incorporação de produtos de interesse do MS, com destaque para o acordo firmado em 2004 com o *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología* (CIGB) para a produção de IFNα-2b.

A importância desse acordo de transferência de tecnologia foi atender de forma rápida a demanda do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde, o qual foi iniciado em 1982, e tem como principal objetivo a disponibilização de medicamentos de alto custo utilizados para o tratamento de doenças específicas que atingem um número limitado de pacientes.

Por se tratarem de doenças crônicas, sabe-se que os pacientes atendidos pelo programa receberão os produtos por períodos prolongados em uma das unidades ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SUS). Sendo assim, o fornecimento desses medicamentos denominados como de "alto custo" depende da aprovação específica das Secretarias Estaduais de Saúde e de uma avaliação clínica e laboratorial do paciente. Os critérios de inclusão previstos pelo Programa encontram-se estabelecidos nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – PCDT (Ministério da Saúde, 2010).

O IFNα 2b foi incluído especificamente no PCDT da Hepatite Viral C em 2007 (Brasil, 2007). Vale a ressalva que o nome genérico do produto é Interferon alfa 2b humano recombinante, a representação química do seu princípio ativo IFNα 2b, porém, seguindo a Denominação Comum Brasileira (DCB) de 2009, o produto comercializado por Bio-Manguinhos é chamado de Alfainterferona 2b (INFα-2b).

Dessa forma, a produção nacional juntamente com a parceria com as Secretarias Estaduais de Saúde garantem a distribuição desse biofármaco o que permite que a população brasileira tenha acesso gratuito e garantido a um medicamento extremamente importante e de elevada tecnologia, fortalecendo os princípios de universalidade, integralidade e equidade que norteiam as ações do SUS contribuindo, dessa forma, para a redução dos gastos do Ministério da Saúde.

1.3 – Interferons

Os interferons foram a primeira família de citocinas a ser descoberta. Em 1957 pesquisadores observaram que se células animais susceptíveis fossem expostas à infecção viral, estas células imediatamente tornavam-se resistentes ao ataque de outros vírus (Isaacs e Lindenmann, 1957). Esta resistência foi induzida por uma substância secretada pelas células infectadas com o vírus, a qual foi chamada de "interferon" (IFN). Subsequentemente, foi mostrado que a maioria das espécies animais produzia de fato um extenso conjunto de interferons (Walsh, 2003).

Segundo Walsh (2003), os interferons são produzidos por uma variedade de diferentes tipos celulares, e exibem uma ampla faixa de efeitos biológicos, incluindo:

- Indução de resistência celular a infecção viral;
- Regulação da resposta imune;
- Regulação do crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares;
- Sustentação das fases primárias da gravidez em algumas espécies animais.

Os IFNs são potentes citocinas e elementos-chave na estimulação da resposta imune inata antiviral. Os IFNs medeiam os efeitos antivirais por meio da ativação da transcrição de genes IFN-estimulado (ISGs – *Interferon Stimulated Genes*) (McHutchinson, 2004) (Figura 1.1). Os ISGs são principalmente induzidos pela sinalização intracelular desencadeada por IFN através do receptor de IFN α/ß, que ativa o sinal Janus quinase transdutor e ativador da via de transcrição (Jak-STAT – *Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Figura 1.1c) (Feld e Hoofnagle, 2005). O IFN desencadeia a fosforilação de STAT1(*Signal Transducer and Activator of Transcription type* 1) e STAT2 (*Signal Transducer and Activator of Transcription type* 2) para mediar a ativação de STAT e a formação do complexo ISGF3 (*Interferon-Stimulated Genes Factor* 3) consistindo de STAT1, STAT2 e IRF-9 (*Interferon Regulatory Factor* 9**)** (Der et al, 1998; Heim, 1999). O ISGF3 liga-se ao elemento de resposta estimulado por interferon (ISRE – *Interferon-Sensitive Response Element*) dentro da região promotora do ISGs para induzir a expressão do gene. Os produtos ISG difundem ações celulares que limitam a replicação viral e o espalhamento viral célula a célula e indiretamente modulam a maturação da resposta imune adaptativa (Figura 1.1d) (Stark et al., 1998; Shimazaki et al., 2002). Os IFNs são produzidos naturalmente durante a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) ou outros vírus. No caso do HCV, o reconhecimento do RNA viral pela proteína gene-I indutor

de ácido retinóico (RIG-I – *Retinoic acid Inducible Gene I*) desencadeia uma cascata de sinalização através do estimulador promotor 1 de IFN proteína simuladora-1 (IPS-1 – *Interferon Promoter Stimulator* 1) promotora de interferon essencial, levando à ativação do fator de transcrição fator-3 regulador de interferon (IRF-3) e a indução e uma expressão de IFN α/ß (Sen, 2001; Guo et al., 2001). O HCV pode antagonizar a sinalização RIG-I a IRF-3 através das ações da protease viral NS3/4A, que alveja e cliva IPS-1 interrompendo a ativação de IRF-3 (Guo et al., 2001; Foy et al., 2005) (Figura 1.1a). Assim, a aplicação terapêutica do IFN para mediar a alta expressão sustentada de ISG e, concomitantemente, promover ou restaurar a sinalização de RIG-I nas células infectadas pode proporcionar aumento da potência antiviral contra HCV (Erickson, 2008).

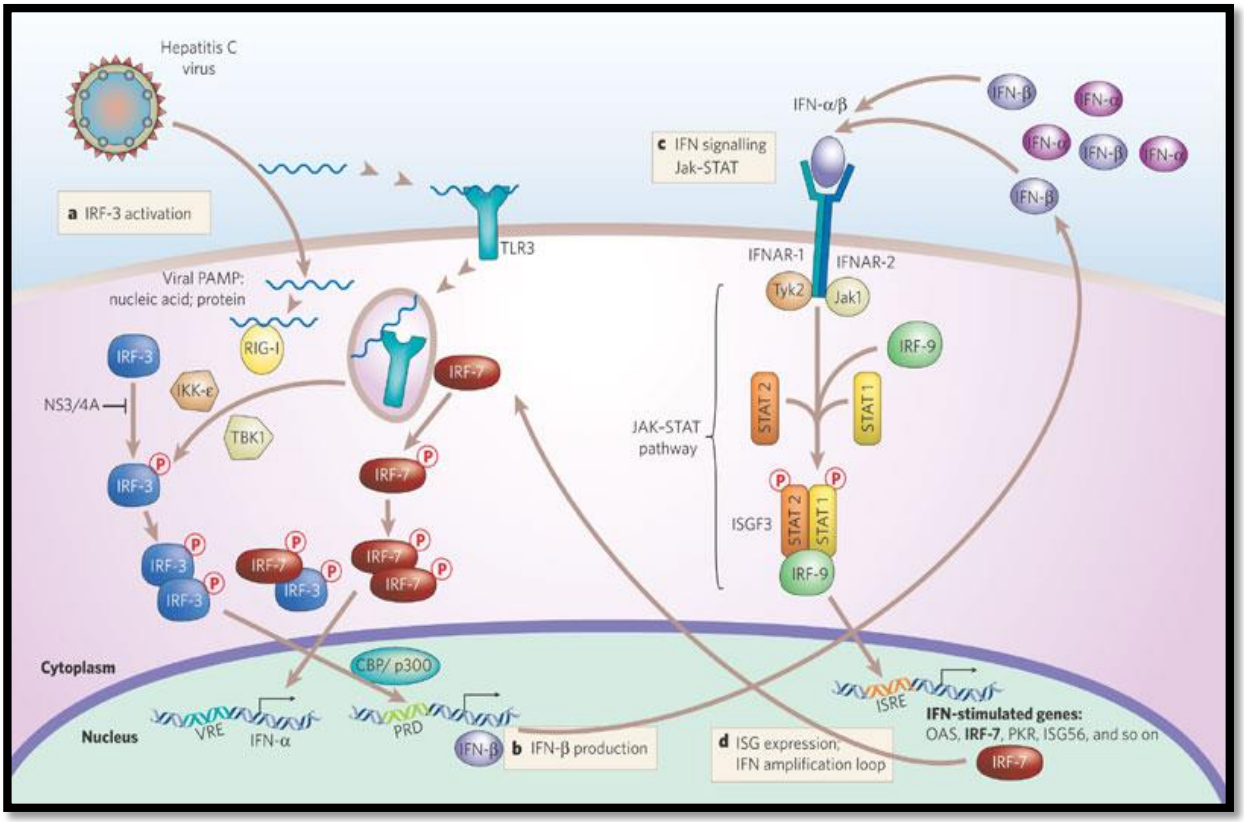


Figura 1.1: Ação do IFN na infecção por HCV. (**a**) Ligação da PAMP viral (HCV RNA) a RIG-I ou TLR3 resulta na fosforilação e ativação do IRF-3 pelas proteínas quinase TBK1 ou IKK-ε. O dímero de fosfo-IRF-3 transloca para o núcleo da célula, interage com seus parceiros de transcrição, incluindo CBP/p300 e se liga ao domínio regulatório positivo de DNA (PRD) na região promotora dos genes-alvo do IRF-3, incluindo IFN-β. **(b)** A ativação de IRF-3 resulta na produção e secreção de IFN-β pela célula infectada. **(c) O** IFN-β se liga ao receptor de IFN-α/β e ativa as proteínas quinases associadas Tyk2 e Jak1 para dirigir a fosforilação e montagem de um heterodímero STAT1-STAT2 e o complexo trimérico ISGF3 contendo IRF-9. O complexo ISGF3 se aloca ao núcleo da célula, onde se liga ao ISRE em genes-alvo para direcionar a expressão de ISG. **(d)** Os ISGs são os efetores genéticos da resposta do hospedeiro. IRF-7 é um fator de transcrição e um ISG. Ele é ativado após a expressão através de vias de sinalização PAMP viral que se sobrepõem com os caminhos da ativação de IRF-3. A fosforilação, dimerização e heterodimerização de IRF-7 com IRF-3 permite sua ligação ao elemento cognato de resposta ao (VRE) na região promotora dos genes de IFN-α, resultando na produção de diversos subtipos de IFN-α que sinaliza a expressão de ISG . Isso aumenta a abundância de RIG-I e PAMP viral cujos componentes continuam a sinalização sinalização para amplificar a produção de IFN e a resposta do hospedeiro. A administração terapêutica do IFN-α fornece ação antiviral contra HCV por sinalização e expressão de ISG através do receptor IFN-α/β e a via Jak-STAT. A separação de RIG-I e TLR3 sinalizada por proteases HCV NS3/4A, bloqueia a ativação de IRF-3 e atenua a resposta do hospedeiro à infecção (Fonte: Gale e Foy, 2005).

1.4 – Alfainterferona 2b

Empregando-se a técnica de DNA recombinante, ferramentas de biotecnologia e boas práticas de fabricação, foi possível padronizar e comercializar várias formulações de interferon para uso terapêutico. Esta proteína terapêutica (biofármaco) tem sido amplamente aplicado em incontáveis doenças (Srivastava et al. 2005).

Vários estudos foram realizados em hepatite C crônica, incluindo indivíduos de todas as idades e sexos. Os estudos compreenderam tanto o uso de monoterapia com Alfainterferona 2b como em combinação com ribavirina. Em todos os estudos, os dados de eficácia clínica e de segurança são comparáveis aos da literatura internacional com Alfainterferona (Bio-Manguinhos, 2006). Até o momento. a terapia com Interferon para a hepatite C crônica (HCC) tem sido o único tratamento que pode eliminar completamente o vírus. A terapia de combinação com IFN peguilado (Peg-IFN) e ribavirina tem sido amplamente recomendada como a primeira escolha para pacientes com hepatite C crônica com altas cargas virais (Nagao e Sata, 2010). A taxa de resposta virológica sustentada (RVS), para o HCV genótipo 1, após 48 semanas de tratamento com uma dose padrão é de aproximadamente 40 a 50% (Hadziyannis et al., 2004; Mangia et al., 2008). Tem sido demonstrado que a terapia com IFN diminui a taxa de desenvolvimento de HCC e melhora o prognóstico a longo prazo (Yoshida et al., 1999; Mazzaferro et al., 2006).

Nos últimos anos, ensaios clínicos utilizando agentes antivirais de ação direta contra o HCV, têm mostrado que os inibidores de protease são uma estratégia eficaz para o tratamento do genótipo 1. Boceprevir e Telaprevir são os primeiros inibidores de protease para tratamento do HCV e foram recentemente registrados na ANVISA, permitindo sua introdução no arsenal terapêutico nacional. Essas duas medicações apresentam moléculas diferentes e atuam inibindo a enzima proteas e serina NS3 do HCV, agindo diretamente sobre o vírus da Hepatite C através do bloqueio da sua replicação. Ambos são utilizados em associação com IFN peguilhado e ribavirina, constituindo assim uma terapia tripla (Ministério da Saúde, 2012).

Em outras enfermidades virais que constituem indicações aprovadas para o Alfainterferona 2b se incluem estudos em hepatite B crônica; hepatite C aguda; indivíduos infectados por HIV em etapas iniciais da infecção; infecções por Papiloma Vírus. Neste último grupo, cabe destacar o programa nacional de uso de Alfainterferona 2b em Papilomatose Respiratória Recorrente, onde o estudo indica um impacto do produto na solução desse

problema de saúde. A indicação mais importante do Alfainterferon 2b em neoplasias é a leucemia mielóide crônica, na qual são relatados 3 estudos com 67 pacientes, demonstrando a eficácia do produto nesta indicação, alcançando aumento significativo do intervalo livre de recaídas e da sobrevida (Bio-Manguinhos, 2006).

Além desses, o carcinoma de célula renal (RCC) tem sido historicamente tratado com IFNα com taxa de resposta de 10 a 15% e sobrevivência média de 12 meses (Motzer et al., 2002; Rini et al., 2010). IFNα também tem demonstrado uma vantagem de sobrevivência modesta em relação aos hormônios e quimioterapia em ensaios clínicos aleatórios e meta-análises (Coppin et al., 2005; Rini et al., 2010).

As propriedades antivirais, antitumorais e imunomoduladoras dos interferons garantiram sua aprovação para uma variedade de aplicações terapêuticas. Atualmente, a maioria das Alfainterferona 2b fabricadas e vendidas pelas companhias biofarmacêuticas são produzidos em *E. coli* (Pestka, 2007; Walsh, 2003).

1.5 - Controle de Qualidade

O movimento da qualidade pode traçar suas raízes de volta à Europa medieval, onde os artesãos começaram a se organizar em sindicatos chamados guildas no final do século 13. Até o início do século 19, a fabricação no mundo industrializado tendeu a seguir esse modelo artesanal. O sistema fabril, com sua ênfase na inspeção do produto, começou na Grã-Bretanha na Revolução Industrial, no início de 1800. No início do século 20, os fabricantes começaram a incluir os processos de qualidade nas práticas industriais (Figura 1.2).

Depois que os Estados Unidos (EUA) entraram na Segunda Guerra Mundial, qualidade tornou-se um componente crítico do esforço de guerra. O nascimento de qualidade total nos Estados Unidos veio como uma resposta direta à revolução de qualidade no Japão após a Segunda Guerra Mundial (American Society For Quality, 2011) (Figura 1.2).

A partir da década de 50, surgiu a preocupação com a gestão da qualidade, que trouxe uma nova filosofia gerencial com base no desenvolvimento e na aplicação de conceitos, métodos e técnicas adequados à uma nova realidade. A gestão da qualidade total, como ficou conhecida essa nova filosofia gerencial, marcou o deslocamento da análise do produto ou serviço para a concepção de um sistema da qualidade. A qualidade deixou de ser um aspecto do produto e responsabilidade apenas de departamento específico, e passou a ser um problema

da empresa, abrangendo, como tal, todos os aspectos de sua operação (Longo, 1996) (Figura 1.2).

Na década de 1970, os setores industriais dos EUA, tais como automóveis e eletroeletrônicos perderam destaque pela concorrência japonesa de alta qualidade. A resposta dos EUA, enfatizando não apenas estatísticas, mas abordagens que abraçaram toda a organização tornaram-se conhecidas como Gestão da Qualidade Total (TQM) (Figura 1.2). Na última década do século 20, o TQM foi considerado um modismo por muitos líderes empresariais. Mas, enquanto o uso do termo TQM desapareceu um pouco, principalmente nos Estados Unidos, suas práticas continuaram. Nos poucos anos desde a virada do século, o movimento da qualidade parece ter amadurecido para além da Qualidade Total. Os Sistemas de Qualidade com novas abordagens evoluíram a partir das bases de Deming, Juran e os primeiros praticantes japoneses de qualidade, e foram além de fabricação em serviço, saúde, educação e setores do governo (American Society For Quality, 2011).

Sendo assim, a Gestão da Qualidade precisa acompanhar as transformações, tendo como objetivo se adequar tanto às novas necessidades das organizações produtivas quanto às novas exigências e características do ambiente competitivo (Chiavenato, 1999).

A adoção de normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle de Qualidade numa indústria farmacêutica e/ou de imunobiológicos é de grande importância, visto que todo o sistema de produção é monitorado sob rigorosos procedimentos, a cada etapa do processo, até o produto ser liberado para comercialização. A versão brasileira de BPF, traduzida da Organização Mundial de Saúde (OMS) pelos especialistas do Ministério da Saúde e da Secretaria da Vigilância Sanitária, surgiu em meados de 1994 (Rosenberg, 2000) e foi revisada na resolução RDC nº 134 em 2001. Atualmente está em vigor a RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, revisada e editada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Figura 1.2).

O Controle de Qualidade consiste em um conjunto de operações cujos objetivos incluem a obtenção de medicamentos cada vez melhores, mais eficazes e seguros, menos tóxicos e mais estáveis. Antigamente, as soluções para estes problemas eram feitas intuitivamente e com base em observações e referências populares, isto é, empiricamente. Hoje, os procedimentos são realizados racionalmente fixando-se hipóteses prévias que podem ou não ser comprovadas experimentalmente (Pinto et al., 2003).

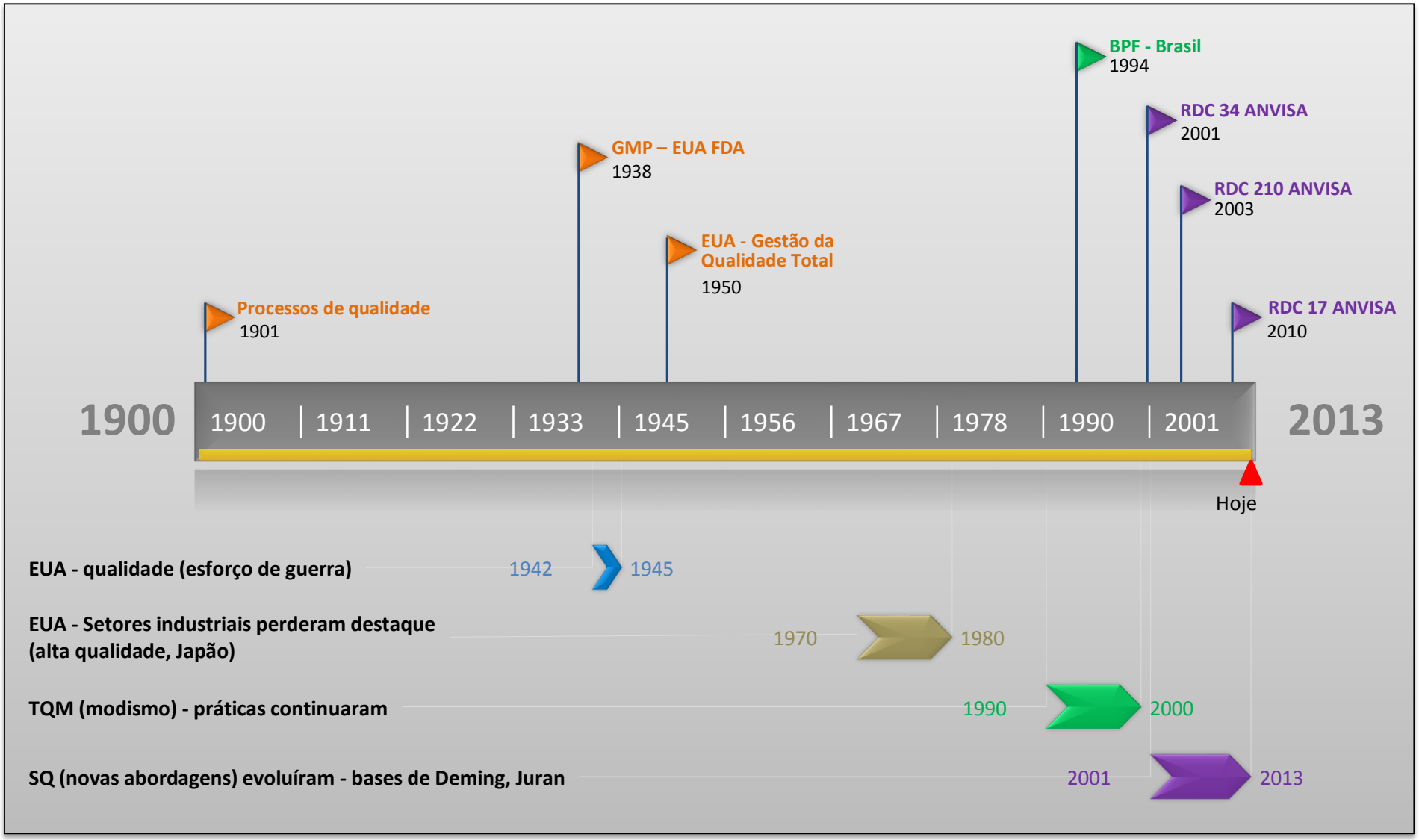


Figura 1.2: Linha do tempo para evolução do processo de qualidade e BPF. **EUA**: Estados Unidos da América; **GMP**: *Good Manufacturing Practice*; **FDA**: *Food and Drug Administration*; **BPF**: Boas Práticas de Fabricação; **RDC**: Resolução da Diretoria Colegiada; **ANVISA**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **TQM**: Gestão da Qualidade Total; **SQ**: Sistema da Qualidade.

Outro objetivo do controle de qualidade é verificar se o produto está em conformidade com as especificações farmacopeicas. A não conformidade representa um somatório de atribuições para a empresa que podem resultar, além dos prejuízos decorrentes do retrabalho, a perda de credibilidade e até a cassação da licença de funcionamento e do registro do produto (Cooper, 1979). Além disso, o controle de qualidade deve estabelecer as especificações, padronizar e validar os métodos analíticos utilizando sempre padrões de referência e, para os casos de possíveis reanálises, reter e armazenar amostras de lotes aprovados e liberados. Deve realizar estudos de estabilidade do princípio ativo e estabelecer o prazo de validade, através de avaliações de estudos acelerados e de longo prazo à temperatura proposta, além de acompanhamento de estabilidade anual. Compete também ao controle de qualidade dar assistência técnica às reclamações concernentes ao controle de qualidade do produto, em conjunto com a garantia da qualidade e marketing, assim como autorizar o descarte de lotes não conformes (Hokama, 2005). Para o paciente, a falta de qualidade do medicamento ocasiona sérios transtornos com o comprometimento da sua saúde (Peixoto et al., 2005).

1.5.1 Métodos Analíticos

Um dos passos de controle da segurança química dos alimentos e produtos farmacêuticos é a obtenção de dados sobre os níveis de certas substâncias que podem estar presentes nos mesmos (contaminantes, resíduos, aditivos e nutrientes). A obtenção destes dados é o resultado de um processo que começa com a seleção e validação de um método analítico. A execução deve ser controlada de forma permanente (González-Moreno et al., 1997).

O método analítico é um procedimento que envolve o desmembramento de um todo, quebrando-o em suas partes ou elementos para observar as causas, a natureza e os efeitos. A análise é a observação e consideração de um fato particular. Você deve conhecer a natureza do fenômeno e objeto que está sendo estudado para compreender a sua essência. Este método permite-nos saber mais sobre o objeto de estudo, com o qual se pode: explicar, fazer analogias, entender melhor seu comportamento e desenvolver novas teorias (Marchetti, 2012).

A definição do método analítico para ser usado pressupõe o conhecimento de certo número de fatores, entre os quais: a natureza do analito; a natureza da amostra (a presença de substâncias particulares na matriz da amostra pode afetar a aplicabilidade ou o desempenho de uma técnica analítica); a concentração do analito; e a confiabilidade necessária para a análise. Estes parâmetros determinam a escolha da tecnologia (alguns não podem ser usados porque as

concentrações são muito baixas para serem determinadas, ou a técnica não é suficientemente precisa). Por outro lado, fazer uma análise mais precisa ou exata muitas vezes necessária, conduz frequentemente à despesa adicional. O conhecimento das características de um método analítico permite verificar a adequação da técnica para a aplicação particular (Marchetti, 2012).

A análise dos resíduos e contaminantes em alimentos e produtos farmacêuticos envolve a identificação de substâncias encontradas em quantidades muito pequenas (da ordem de mg/kg ou µg/kg) em matrizes complexas. Por conseguinte, é necessário realizar uma primeira extração quantitativa da substância, além de purificar e/ou concentrar o extrato obtido, antes da sua detecção e quantificação. Para a seleção correta de um método analítico, entendendo como método o conjunto sucessivo das fases indicadas de extração, purificação e identificação (detecção e/ou quantificação), devemos considerar todos os fatores que podem influenciar na validade do resultado em relação às razões que levaram à sua aplicação (González-Moreno et al., 1997).

Segundo Brandão (2001), os principais métodos analíticos são:

→ Métodos químicos

São os métodos resultantes de um processo de transformação química, descritos pela maioria das farmacopeias oficiais, por serem os mais acessíveis e de menor custo. Classificam-se em: gravimétrico, volumétrico e gasométrico. Os métodos químicos de identificação de funções ou determinados grupos químicos presentes em fármacos, consistem em reações que resultam em formação de precipitado, produto colorido, desprendimento de gás, descoramento do reagente usado ou outro fenômeno qualquer, facilmente perceptível. Estes ensaios não são aplicáveis em uma mistura de fármacos.

→ Métodos físicos

São aqueles descritos pela ciência básica. Classificam-se em: mecânicos (medição de energia e força); térmicos (medição de temperatura); óticos (medição de energia radiante, absorção, transformação e emissão); elétricos (medição de fenômenos eletroquímicos); radioquímicos (medição de radioatividade).

→ Métodos biológicos

São aqueles utilizados para medir a potência (atividade) de um medicamento (grau de inibição de um agente microbiano por exemplo), também é utilizado para contagem de agentes patógenos de uma determinada amostra ou matéria-prima que utiliza reagentes biológicos, tais como microrganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais. A característica dos reagentes biológicos é a sua variabilidade. Para que possamos estudá-los, é necessário o emprego de padrões de referências adequados e métodos estatísticos, bem como uma criteriosa análise dos resultados.

1.5.2 Garantia de Qualidade Analítica

Os procedimentos de Garantia de Qualidade Analítica (GQA) devem ser baseados em um sistema de rastreabilidade e *feedback*. A rastreabilidade, neste contexto, exige que todas as etapas de um procedimento possam ser verificadas, sempre que possível, por referência aos resultados documentados, às calibrações, às normas, aos cálculos e outros. Por exemplo, onde o equilíbrio é fundamental para um equipamento de laboratório, a precisão da medição deve ser verificada regularmente. Os pesos utilizados para este fim devem ter um certificado demonstrando que obedecem a um padrão que deve ser verificado regularmente contra tais normas pelo uso regular de pesos de seleção que estão bem documentados e, portanto, podem ser ligados dentro do laboratório ao padrão de calibração. Este princípio também se aplica para a calibração de outros equipamentos (WHO, 1996).

O *feedback* é o princípio de que os problemas ou omissões no sistema GQA devem ser levados ao conhecimento da administração. Quando, em um laboratório, ocorrem problemas, os procedimentos devem assegurar que isso seja facilmente reconhecido e corrigido. Os critérios para o reconhecimento e correção de mau desempenho, bem como as responsabilidades de ação corretiva devem ser identificados. Os procedimentos para alcançar este reconhecimento e correção devem ser claramente estabelecidos (WHO, 1996). Os sistemas de controle baseados na análise estatística, usados em programas de controle de qualidade interno e externo, também devem estar em conformidade com os princípios de rastreabilidade e de *feedback* para garantir que os critérios corretos adequados para a qualidade sejam adotados e que eventuais problemas sejam rapidamente reconhecidos e corrigidos (WHO, 1996). É importante conhecer algumas definições associadas à Garantia de Qualidade Analítica para um melhor entendimento da mesma (tabela 1.1).

Tabela 1.1: Definições associadas à Garantia de Qualidade Analítica (Adaptado de WHO, 1996).

TERMO	DEFINIÇÃO
Qualidade	A totalidade das características de uma entidade relacionada com sua capacidade de satisfazer necessidades explícitas e implícitas.
Política da qualidade	As intenções e princípios gerais de uma organização com relação à qualidade, como formalmente é expressada pela alta administração. A política de qualidade constitui um elemento da política corporativa e está autorizada pela alta administração.
Garantia da qualidade	Todas as atividades planejadas e sistematicamente implementadas no sistema da qualidade e demonstradas como necessárias para proporcionar confiança adequada de que uma entidade venha a cumprir os requisitos de qualidade.
Sistema da qualidade	Estrutura organizacional, procedimentos, processos e recursos necessários para implementar a gestão de qualidade.
Estrutura organizacional	As responsabilidades, autoridades e relacionamentos através dos quais uma organização executa suas funções.
Procedimento	Uma forma especificada de executar uma atividade. Quando um procedimento está documentado os termos "Procedimento Operacional Padrão" ou "procedimento documentado" são frequentemente usados. Um procedimento documentado geralmente contém os objetivos e âmbitos de uma atividade, o que deve ser feito e por quem, quando, onde e como deve ser feito, quais os materiais, equipamentos e documentos devem ser usados e como ele deve ser controlado e registrado.
Processo	Um conjunto de recursos inter-relacionados e atividades que transformam entradas em saídas. Os recursos podem incluir pessoal, finanças, instalações, equipamentos, técnicas e métodos.
Gestão da qualidade	Todas as atividades da função de gestão global que determinam a política da qualidade, objetivos e responsabilidades. São implementados por meios tais como o planejamento da qualidade, o controle de qualidade, a garantia de qualidade e a melhoria da qualidade dentro do sistema de qualidade.
Controle de qualidade	Abrange as técnicas e atividades operacionais que são utilizados para satisfazer as exigências de qualidade. Os termos de "controle de qualidade interno" e "controle de qualidade externo" são comumente usados. O primeiro se refere às atividades realizadas dentro de um laboratório para monitorar o desempenho e o segundo se refere às atividades que levam à comparação com outros laboratórios de referência ou resultados de consenso entre os vários laboratórios.
Auditoria de qualidade	Exame sistemático e independente para determinar se as atividades de qualidade e resultados obtidos satisfazem as disposições previstas e se estas disposições são aplicadas eficazmente e se são adequadas para alcançar os objetivos.
Rastreabilidade	Capacidade de rastrear a história, aplicação ou localização de uma entidade por meio de identificações registradas. No contexto da calibração, refere-se ao equipamento de medição para as normas nacionais e internacionais, padrões primários, propriedades ou constantes físicas básicas (temperatura, pressão, volume por exemplo), ou materiais de referência. No contexto da coleção de dados, correlaciona o cálculo e os dados gerados com os requisitos de qualidade para a entidade.

1.6 - Validação dos ensaios analíticos

Qualquer método analítico antes de ser utilizado deve ser validado, assim os controles são realizados para garantir que o método seja cientificamente correto nas condições que serão aplicadas (ANVISA-RE 899, 2003). No processo de validação são verificadas suas interfaces de usuário em termos de seletividade, especificidade, sensibilidade, linearidade, limites de detecção, identificação ou quantificação, exatidão e precisão, seguindo normas internacionais e/ou nacionais. O processo para determinar o rigor dos métodos é realizado com materiais de referência certificados, se possível, ou com amostras enriquecidas artificialmente em caso de indisponibilidade de materiais de referência adequados. A precisão do método é calculada por repetição da análise da mesma amostra (González-Moreno et al., 1997).

A validação é um processo estabelecido por evidências documentadas que comprovam que uma atividade específica apresenta conformidade com as especificações pré-determinadas e atende aos requisitos de qualidade (ANVISA-RE 899, 2003).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão e robustez adequados à análise.

A RE 899 classifica os métodos analíticos e bioanalíticos em quatro categorias e informa quais são os ensaios necessários para cada um deles (tabelas 1.2 e 1.3).

Quadro 1.1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA-RE 899, 2003).

		FINALIDADE DO TESTE
Categoria	**I**	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias–primas
	II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
	III	Testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
	IV	Testes de identificação

Quadro 1.2: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA-RE 899, 2003).

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão (Repetibilidade)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão (Intermediária)	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação		Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; ** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

1.6.1 Precisão e reprodutibilidade.

A Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) através do seu Q2A de qualidade (ICH Q2A, 1994) define a precisão de um procedimento analítico como o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea nas condições prescritas. A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

O Guia Q2B de qualidade do ICH (1996) sugere que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado. Por exemplo, em ensaios cromatográficos, os resultados podem ser obtidos em três concentrações com três injeções em cada concentração.

A precisão intermediária é determinada pela comparação dos resultados de um método realizado dentro de um único laboratório durante certo número de dias. Segundo Huber (2007) a precisão intermediária do método pode refletir diferenças de resultados obtidos por:

- Diferentes operadores;
- Prática de trabalho inconsistente;

- Diferentes instrumentos;
- Padrões e reagentes de diferentes fornecedores;
- Colunas de diferentes lotes;
- Combinação dos mesmos.

O objetivo da precisão intermediária na validação é verificar que no mesmo laboratório o método irá fornecer os mesmos resultados, uma vez que a fase de desenvolvimento é longa. O objetivo da reprodutibilidade é verificar que o método irá fornecer os mesmos resultados em laboratórios diferentes (Huber, 2007).

A reprodutibilidade de um método analítico é determinada através da análise de alíquotas de lotes homogêneos em laboratórios diferentes, com analistas diferentes. Além disso, variações típicas de condições operacionais e ambientais que podem diferir, mas ainda estão dentro dos parâmetros especificados do método, são utilizados. A validação da reprodutibilidade é importante se o método é para ser utilizado em laboratórios diferentes. Fatores que podem influenciar a reprodutibilidade incluem diferenças de temperatura e umidade, ou equipamentos com características diferentes, tais como volume de atraso de um sistema de HPLC, colunas de diferentes fornecedores ou lotes diferentes e operadores com experiência e rigor diferentes (Huber, 2007).

1.6.2 Exatidão

A ICH Q2A (1994) define a exatidão de um procedimento analítico como o grau de concordância entre o valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito e o valor encontrado.

O ICH Q2B (1996) recomenda que a exatidão seja avaliada utilizando um mínimo de nove determinações ao longo de um mínimo de três níveis de concentração que cobre o intervalo especificado (por exemplo, três concentrações com três repetições de cada). A exatidão deve ser relatada como percentagem de recuperação através do ensaio de quantidade adicionada de analito conhecida na amostra ou como a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito juntamente com os intervalos de confiança.

1.6.3 Equivalência analítica

A natureza dos testes de validação é diferente de testes de equivalência. De acordo com o ICH Q2A (1994), "O objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que ele é adequado para a sua finalidade".

Na prática, a validação normalmente determina a qualidade de um único método analítico. A equivalência demonstra a uniformidade de dois métodos analíticos. Dois métodos validados de forma independente não são inerentemente equivalentes. Dois métodos podem ser validados da mesma maneira, com os mesmos critérios, e rendimento de dados não equivalentes, porque as experiências de validação não são projetadas para detectar diferenças nos métodos. A distinção entre validação e equivalência é reconhecida nas orientações para testes de equivalência proposto no Fórum da Pharmacopeia (USP, 2009).

A tendência sempre é uma consideração importante na avaliação de dados, como nas avaliações de estabilidade do produto, o método de equivalência pode oferecer uma vantagem sobre a validação por si só. A equivalência pode ser uma consideração imperativa se uma tendência de descontinuidade na estabilidade indicar uma validade de produtos diferentes. Também é importante saber se um novo método pode produzir resultados cruzando critérios de limites de aceitação comparados com os resultados gerados por um método existente. Se um novo método requer uma mudança fora da faixa validada de um método existente, então ele vai exigir uma validação adicional. Dependendo do grau de mudança, os testes de equivalência podem ser o caminho mais apropriado para um ensaio.

1.7 - Ensaios radioativos de controle de qualidade

Métodos desenvolvidos na década de 1960 para detectar e medir a reassociação entre fitas complementares de ácidos nucléicos levou toda uma geração de biólogos moleculares a confiar exclusivamente em isótopos radioativos - geralmente ^{32}P - para detectar a hibridização entre sondas e sequências alvos. O protocolo mais familiar para os investigadores hoje envolve a detecção de ácidos nucleicos-alvo imobilizados em membranas de nitrocelulose ou nylon (Sambrook, 2001). Esse método descende a partir do trabalho de Nygaard e Hall (1963 *Apud* Sambrook, 2001), que foram os primeiros a imobilizar DNA em membranas de nitrocelulose; Denhardt (1966 *Apud* Sambrook, 2001) e Gillespie e Spiegelman (1965 *Apud* Sambrook, 2001), que detectaram esses ácidos nucléicos fixos com sondas radioativas e Southern (1975 *Apud*

Sambrook, 2001), que desenvolveu métodos para detectar sequências alvo em conjuntos de moléculas de ácido nucleico que haviam sido separadas de acordo com o tamanho, por eletroforese em gel de agarose.

Após a hibridização, as partículas β emitidas pelas sondas radioativas foram medidas e localizadas por contagem de cintilação líquida, autoradiografia, ou, mais recentemente, imagem de fósforo. Assim, há 30 anos, a hibridização de ácidos nucléicos e de radioatividade foram estreitamente interligadas; métodos foram projetados com radioatividade em mente, e os experimentos laboratoriais foram programados em torno da entrega regular das ordens permanentes de compostos radioativos. Desta maneira, tanto as vantagens como os impedimentos do trabalho com isótopos radioativos tornaram-se institucionalizados e fazeram parte da cultura de clonagem molecular (Sambrook, 2001).

Embora as sondas marcadas com ^{32}P possam detectar pequenas quantidades de DNA alvo imobilizado (<1 pg), estas possuem uma meia-vida curta (14,3 dias) e são incapazes de serem utilizadas para obtenção de imagem de alta resolução. Além disso, quando utilizado em grande quantidade como ocorre com o ortofosfato, ^{32}P deve ser manuseado em laboratórios de isótopos especialmente concebidos a esse propósito. A exposição do pessoal à radiação das partículas energéticas β liberadas pela decomposição de ^{32}P pode ser significativa. Não surpreendentemente, a quantidade de documentação e equipamento necessário para ordenar e monitorar o uso e descarte de materiais radioativos tem aumentado significativamente ao longo dos anos, ao ponto de se tornar um verdadeiro fardo para as Instituições de Pesquisa e Desenvolvimento. Além disso, as dificuldades físicas e as políticas no armazenamento e disposição de resíduos radioativos de baixo nível tornaram-se significativas e continuam a crescer. A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) que é o órgão superior de planejamento, orientação, supervisão, fiscalização e estabelece normas e regulamentos em radioproteção e licença, fiscaliza e controla a atividade nuclear no Brasil. Ela estabelece por meio de suas normas sobre a permissão e qualificação de quem pode trabalhar com material radioativo, além de fornecer as obrigações sobre o transporte desse material. A norma NN-6.01 (1998) da CNEN informa os requisitos para o registro de pessoas físicas para o preparo e manuseio de fontes radioativas e a norma CNEN-NE-5.01 (1988) estabelece todas as regras para o transporte de materiais radioativos. Pelas normas, verifica-se que há uma legislação muito rígida sobre o trabalho com material radioativo e confirma-se o grande volume de

informações, regras, etapas e obrigações que tornam o trabalho desse tipo muito burocrático e complexo.

O ensaio mais comum para a detecção de DNA contaminante do hospedeiro em proteínas terapêuticas (biofármacos) faz uso de material radioativo, entretanto, tecnologias mais sofisticadas com marcadores não radioativos estão disponíveis, um dos motivos pelo qual Bio-Manguinhos não possui mais licença para o trabalho com radioisótopos. Aliado a essas novas metodologias existe a grande burocracia exigida pela CNEN para a concessão de registro de pessoal hábil para lidar com esse tipo de material, além de treinamentos, transporte e descarte do material radioativo, que tornaria o trabalho, de uma forma geral, muito árduo e complexo.

A confluência destes fatos tem levado à busca de métodos alternativos que são tão sensíveis, contudo menos perigosos e dispendiosos do que as técnicas de radioquímica (Sambrook, 2001).

Na tabela 1.2 verificam-se os principais ensaios que utilizam sondas de ácidos nucléicos radiomarcadas *in vitro*.

1.8 - Métodos Analíticos Farmacopeicos

Embora os produtos biológicos/biotecnológicos possam estar sujeitos a perdas significativas de atividade, alterações físico-químicas ou degradação durante o armazenamento, os regulamentos nacionais e internacionais têm fornecido pouca orientação no que diz respeito à distinção às especificações de liberação e término do período de vida útil. As recomendações para o máximo de perdas aceitáveis de atividade, os limites para as alterações físico-químicas, ou de degradação durante o prazo de validade não foram desenvolvidos para tipos individuais ou grupos de produtos biológicos/biotecnológicos, mas são considerados numa base caso a caso. Cada produto deve manter as suas especificações dentro dos limites estabelecidos para a segurança, pureza e potência em toda a sua proposta de vida de prateleira. Estas especificações e limites devem ser derivados de todas as informações disponíveis através dos métodos estatísticos apropriados. O uso de diferentes especificações para liberação e de validade devem ser apoiadas por dados suficientes para demonstrar que o desempenho clínico não é afetado como discutido no ICH em um dos seus guias sobre a estabilidade (ICH Q5C, 1995).

A análise de produtos derivados da biotecnologia baseia-se fortemente no uso de métodos analíticos sofisticados para demonstrar a identidade estrutural e a homogeneidade de proteínas, além de avaliar a vida útil ou a estabilidade desses produtos (USP, 2009).

Existem inúmeros métodos analíticos que dizem respeito aos produtos derivados de biotecnologia. (USP, 2009). A Farmacopeia Americana (2009), lista como métodos analíticos típicos para produtos biotecnológicos os seguintes ensaios:

→ Teor de proteína;
→ Análise de aminoácidos;
→ Sequenciamento de proteína;
→ Imunoensaios;
→ Eletroforese;
→ Métodos cromatográficos;
→ Determinação de carboidrato;
→ Detecção de agentes adventícios e endógenos.
→ Ensaios quantitativos;
→ Determinação de DNA;

Em relação aos objetivos deste trabalho destacam-se os dois últimos métodos.

Os ensaios biomiméticos (ensaios que imitam o efeito biológico do produto) são de grande importância na discussão de ensaios para produtos biotecnológicos. Esses ensaios medem a atividade do produto e garantem a sua eficácia. Essencialmente, há três tipos principais de ensaios quantitativos: os ensaios de modelo animal, os ensaios baseados em cultura de células e os ensaios *in vitro* (físico-químicos), sendo esse importante para este trabalho. Independentemente do tipo de ensaio quantitativo utilizado, é desejável e em muitos casos necessário o uso do ensaio biomimético. O grupo de ensaios *in vitro* (físico-químicos) não depende de um modelo vivo, contudo é usualmente baseado na ação química do produto biológico. Esses métodos são comparativamente simples, rápidos, precisos e exatos (USP, 2009).

Tabela 1.2: Usos principais de sondas de ácidos nucléicos radiomarcadas *in vitro* (Modificado de Sambrook, 2001)

MÉTODO DE MARCAÇÃO	TIPO DE SONDA	POSIÇÃO DO MARCADOR	TAMANHO DA SONDA	USOS PRINCIPAIS
Iniciação aleatória usando modelos de DNA	DNA dupla fita	Interno	~ 400-600 nucleotídeos	Southern e northern blotting e para bibliotecas de triagem
Iniciação aleatória usando modelos de RNA	DNA fita simples ou híbridos DNA-RNA	Interno	~ 400-600 nucleotídeos	Triagem diferencial de bibliotecas de cDNA; sondas subtraídas; exibição diferencial
Iniciação com oligo(dT) da síntese de cDNA usando modelos de RNA	cDNA fita simples ou híbridos cDNA-RNA	Interno	~ 400-600 nucleotídeos	Sondas subtraídas; exibição diferencial
PCR	DNA fita simples ou dupla	Interno	Gera moléculas de DNA marcadas de comprimento definido, dependendo do espaçamento dos iniciadores	Mapeamento de junções de terminal 5' e de ligação em mRNA por nuclease; Southern, northern blotting e bibliotecas de triagem por hibridização
Nick translation	DNA dupla fita	Interno	~ 400 nucleotídeos	Southern, northern blotting e bibliotecas de triagem
Extensão de iniciadores usando iniciadores universais ou alvo-específicos e modelos de DNA fita simples	DNA dupla fita	Interno	Gera moléculas de DNA marcadas de comprimento definido de bacteriófago M13 ou fagemídeo de modelo de DNA; os comprimentos dos DNAs são de 150 pb a 2 kb, dependendo do espaçamento dos iniciadores	Mapeamento de junções de terminal 5' e de ligação em mRNA por nuclease; Southern, northern blotting e bibliotecas de triagem por hibridização
Extensão de iniciadores usando dois iniciadores universais e modelos de DNA fita simples	DNA dupla fita	Interno	Gera sondas de comprimentos heterogêneos (normalmente 200-300 nucleotídeos)	Southern, northern blotting e bibliotecas de triagem
Transcrição *in vitro* de modelos de DNA dupla fita	RNA fita simples	Interno	Gera moléculas de RNA radiomarcadas de comprimentos definidos	Mapeamento de junções de terminal e de ligação em mRNAs por proteção à RNase; Southern e northern blotting e para bibliotecas de triagem; hibridização *in situ*
Adição de nucleotídeos para fazer uma pausa ou projetar os terminais 3' de DNA dupla fita	DNA dupla fita	Terminal 3'	Gera moléculas de DNA radiomarcadas de comprimentos definidos e com posição das marcações definidas	Sequenciamento Maxam-Gilbert; mapeamento de junções de terminal e de ligação em mRNA por nucleasse; marcadores de tamanho de DNA radiomarcados; footprinting e proteção de ribonuclease
Fosforilação dos terminais 5' de DNA dupla fita	DNA dupla fita	Terminal 5'	Gera moléculas de DNA radiomarcadas de comprimentos definidos e com posição das marcações definidas	Sequenciamento Maxam-Gilbert; mapeamento de junções de terminal e de ligação em mRNA por nucleasse; marcadores de tamanho de DNA radiomarcados; footprinting e proteção de ribonuclease

O DNA residual de células hospedeiras é um potencial processo-específico de impureza em um produto derivado de biotecnologia. O DNA residual é único para cada produto, pois é dependente do organismo hospedeiro e do procedimento de recuperação usado na produção do mesmo. Embora não tenha havido relatos de efeitos adversos para a saúde de produtos biotecnológicos pelo seu conteúdo de DNA, as agências regulatórias têm requerido às indústrias a garantia que o nível de DNA nesses produtos seja reduzido a níveis baixos (USP, 2009).

A técnica da hibridização radioativa de DNA (análise dot blot radioativo) é referência e rotineira para determinar o conteúdo de DNA nos produtos. É valioso como ensaio de processo de purificação para demonstrar que um baixo nível de DNA foi atingido no início do processo de fabrico. O método baseia-se na hibridização do DNA celular da amostra com sondas específicas de DNA marcadas por ^{32}P ou modificados quimicamente, obtidos do DNA da célula hospedeira. A sensibilidade do ensaio, isto é, 10 a 250 pg, é determinada pelo limite de detecção visual acima dos padrões de DNA diluídos sericamente (USP, 2009).

Outros métodos para a determinação de DNA têm sido desenvolvidos utilizando-se a tecnologia de biosensor. Essa metodologia atualmente determina o total de impurezas de DNA/ácidos nucléicos em vez do DNA de células hospedeiras. Essa tecnologia pode se tornar muito valiosa no futuro, especialmente quando mais métodos de ligação de DNA forem desenvolvidos (USP, 2009).

Finalmente, a tecnologia de reação em cadeia de polimerase (PCR), a qual envolve a amplificação de DNA, pode ser útil na detecção e identificação de DNA contaminante. O uso quantitativo dessa tecnologia em controle de qualidade rotineiro, contudo, necessita de mais desenvolvimento (USP, 2009) e talvez uma diminuição no custo de compra e manutenção dos equipamentos para que estes custos não sejam repassados para o produto final.

1.9 - Detecção de Traços de DNA

Traços contaminantes de DNA em proteínas terapêuticas ou anticorpos monoclonais injetáveis podem sujeitar a riscos consideráveis (discutidos no item 5.4). Consequentemente, o FDA e as indústrias biofarmacêuticas têm adotado guias restritivos em relação à pureza desses medicamentos. Tradicionalmente, a quantidade de DNA em amostra é determinada por medição espectrofotométrica ou fluorometricamente a partir de fluorocromos, como o brometo de etídio. Nenhum desses métodos pode detectar concentrações de DNA menores que 10 ng/ml.

A técnica comumente utilizada de hibridização para detecção de sequência específica de DNA tem sensibilidade em torno de 10 pg de DNA. No entanto, vários fatores tornam impraticável a hibridização de rotina para testar os contaminantes de DNA: é trabalhoso, é demorado, é semi-quantitativo na melhor das hipóteses, e geralmente requer um radioisótopo. Além disso, a especificidade do método pode fazer com que algum DNA contaminante passe despercebido (Kung et al, 1990).

Uma tarefa crítica durante a produção de biofármacos é a purificação do Ingrediente Farmacêutico Ativo (IFA). O processo *downstream* deve remover todos os contaminantes, incluindo o material da célula hospedeira, tais como DNA e de proteína celular. Quantidades vestigiais de DNA e proteínas da célula hospedeira podem ser co-purificados juntamente com a IFA. Tais contaminantes são obviamente indesejáveis, porque é possível que haja consequências quando injetados em pacientes. Eles podem causar reações alérgicas (proteínas) ou mesmo a transfecção de células (DNA), resultando em tumores (Wolter e Richter, 2005).

Devido a esses potenciais efeitos negativos, as autoridades reguladoras lançaram diversos documentos de orientação sobre quais níveis de impurezas são aceitáveis. O DNA residual em produtos a granel finais deve ser geralmente inferior a 100 pg por dose terapêutica (FDA, 1997; Lovatt, 2002; Wolter e Richter, 2005; Mehta e Keer, 2007; Lotfipour e Halladj-Nezhadi, 2012). A Anvisa, oficialmente, ainda não definiu um limite para a quantidade de DNA residual de produtos derivados de biotecnologia, contudo a agência solicita às indústrias que essa quantidade seja a mínima possível e as mesmas levam em conta os valores mínimos definidos pelas autoridades internacionais.

Outras referências sugerem que níveis mais elevados podem ser aceitáveis (WHO, 1998). O limite de 100 pg requer um processo de purificação que seja muito eficaz e robusto na remoção de DNA, bem como métodos analíticos que sejam extremamente sensíveis e confiáveis para comprovação (Wolter e Richter, 2005). As proteínas de célula hospedeira na IFA devem estar "abaixo dos níveis detectáveis através de um método analítico altamente sensível" (FDA, 1997). Como regra geral, essa quantidade não deve exceder um nível de cerca de 100 ppm. Mas nenhum limite exato é definido para as proteínas e, portanto, a especificação de proteínas deve ser determinada caso a caso (Wolter e Richter, 2005).

De acordo com a Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA, 1997) duas estratégias diferentes podem ser utilizadas para assegurar que uma substância medicamentosa

se encontre dentro dos limites admissíveis de contaminação com DNA ou proteínas de célula hospedeira. Pode-se validar um processo que remove uma quantidade suficiente de tais contaminantes ou realizar testes de rotina em produto final para determinar se eles estão presentes.

Os ensaios e métodos envolvidos na determinação de DNA residual, qualquer que seja a abordagem utilizada, e as proteínas têm de satisfazer requisitos de validação do ICH (Q2A e Q2B). Obviamente essas técnicas devem ser suficientemente sensíveis para determinar níveis muito baixos de contaminação (por exemplo, na gama ppm).

1.10 - Ensaios para Quantificação de DNA Residual de Células Hospedeiras (DCH)

A produção de biofármacos, tais como anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes, vacinas e ácidos nucléicos requer técnicas especiais e métodos de controle de qualidade. Métodos de cromatografia, eletroforese e imunoquímicos são comumente usados em conjunto para monitorar e otimizar o processo de fabricação de produtos biofarmacêuticos.

O limite de 100 pg de DNA por dose definida pelas autoridades reguladoras é aproximadamente igual à quantidade de DNA de menos de 17 células de ovário de hamster diplóide Chinês (CHO) (Wolter e Richter, 2005). Para determinar essas pequenas quantidades de DNA, um método analítico deve ser extremamente sensível e robusto. Em princípio, três técnicas têm a sensibilidade requerida: a hibridização, os métodos baseados em ligação de DNA de proteína (Como o sistema *Threshold*) (Kung, 1990) e o PCR quantitativo (qPCR) (Lovatt, 2002; Mehta e Keer, 2007). Em 2004, a Farmacopeia Europeia claramente informa que o DNA residual deve ser determinado utilizando técnicas independentes de sequências e passa a especificar que métodos como a hibridização ou ensaios de ligação de DNA de proteína devem ser usados.

1.10.1. Hibridização

Para o estudo proposto, os ensaios de hibridização envolvem a ligação de sondas de DNA (pequenos fragmentos de DNA marcados radioativamente) ao DNA da célula hospedeira desnaturada e imobilizadas em superfície sólida (membrana de nylon), o DNA liga-se à membrana por interação eletrostática. Como o DNA possui, superficialmente, carga negativa, usa-se membrana de carga elétrica positiva. As reivindicações das diretrizes sugerem que as sondas devem ser fabricadas independentes da sequência de DNA. Isso pode ser conseguido,

por exemplo, por um procedimento "*priming* aleatório". As sondas são marcadas com marcadores radioativos ou corantes fluorescentes e se ligam aos alvos complementares durante a hibridização. A detecção do sinal é conseguida com autorradiografia ou através de sistemas de fósforo ou de fluorescência de imagens e o sinal detectado é proporcional à quantidade de DNA imobilizado sobre um filtro (Figura 1.3) (Saunders et al., 1999). Dependendo da sonda utilizada, este ensaio pode ser específico ou não específico de sequência (Wolter e Richter, 2005; Mehta e Keer, 2007).

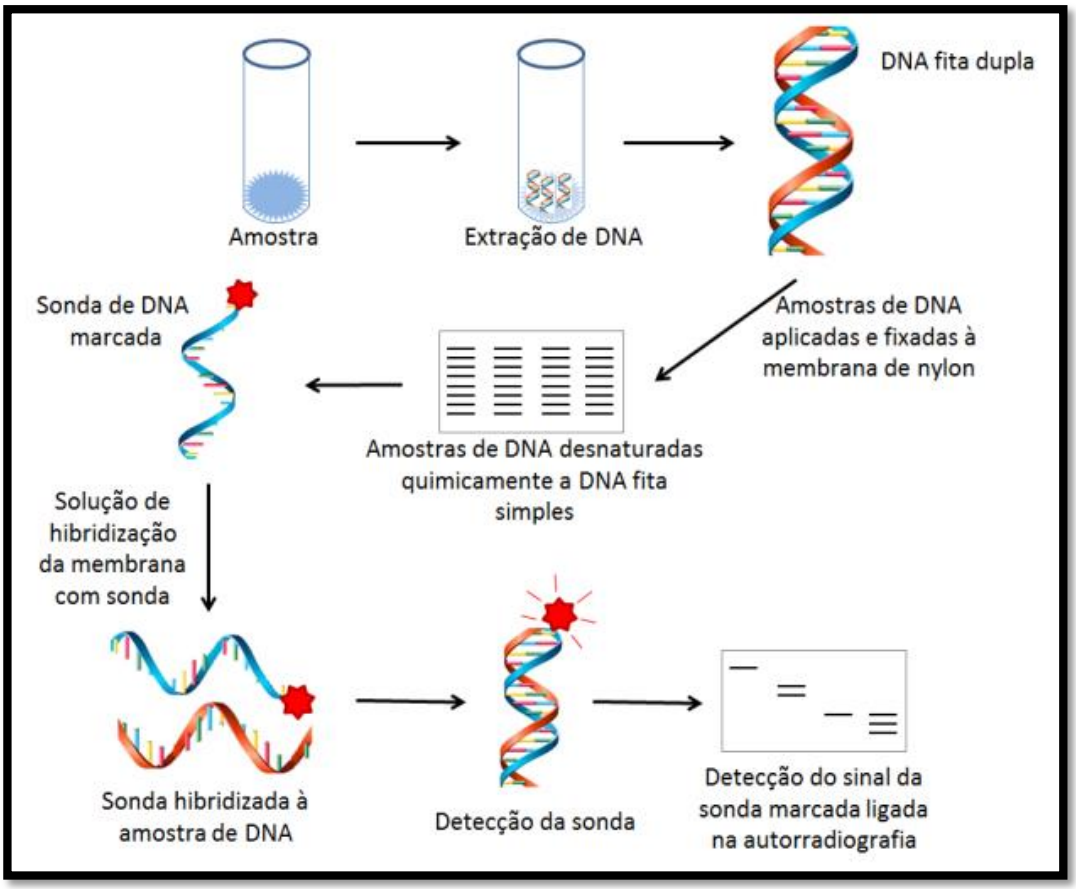


Figura 1.3: O processo de hibridização (Modificado de Mehta e Keer, 2007).

O ensaio de hibridização mede aleatoriamente o DNA total a partir de poucos pares de bases (pb) até milhares de pares de bases de comprimento. É específico para o DNA de origem, mas não para a sequência (Wolter e Richter, 2005).

Todos os ensaios de quantificação do DNA precisam de pré-tratamento da amostra e, por conseguinte, deve ser concebida como ensaios de pico de recuperação para controlar a perda de material durante a preparação da amostra. A figura 1.4 ilustra uma estratégia de controle de recuperação de pico para um ensaio de hibridização. Os padrões de DNA para a célula hospedeira e do vetor em uso, em geral, são comercialmente disponíveis. Portanto, os padrões

internos devem ser produzidos e quantificados por absorção de UV. Esses materiais de referência devem também ser quantificados e qualificados por eletroforese em gel de agarose para confirmar os dados de UV e de degradação de controle de DNA (Wolter e Richter, 2011).

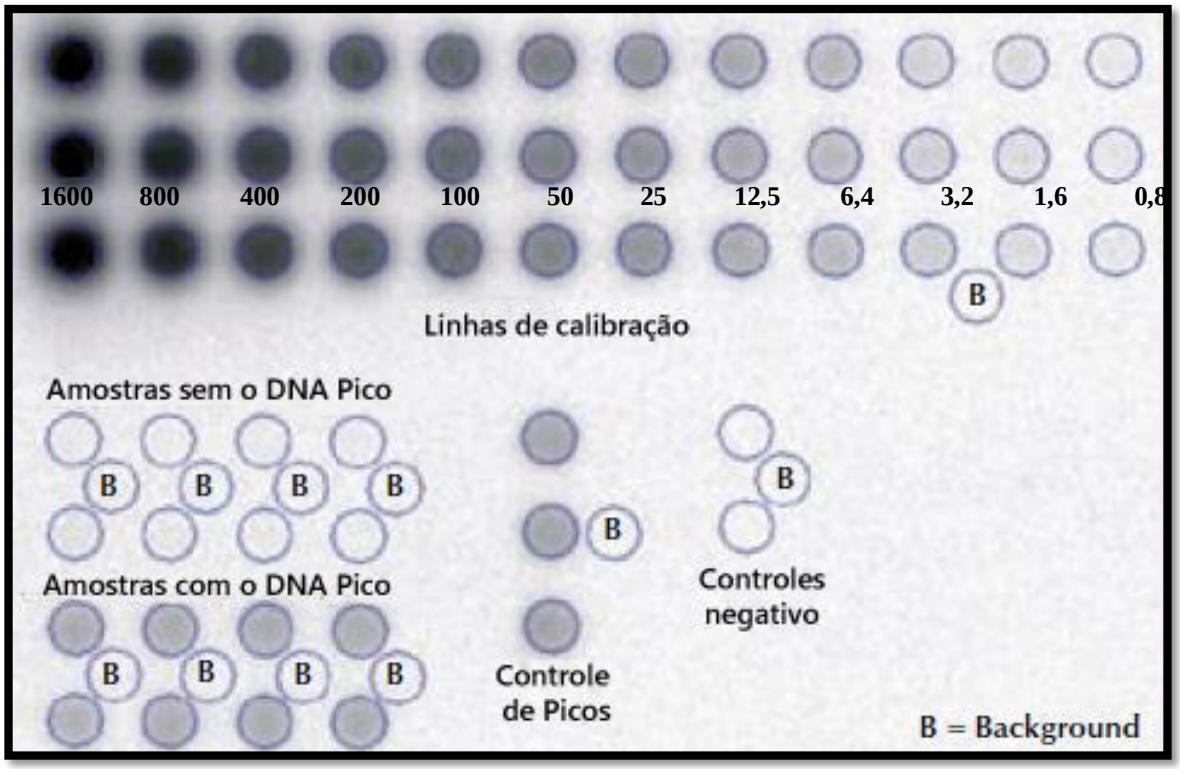


Figura 1.4: Ensaio Dot-Blot de hibridização para a quantificação do DNA genômico residual de *E. coli*. As amostras são analisadas em duplicata, com e sem adição de DNA de referência (DNA Pico). São aplicadas linhas de calibração de DNA genômico de *E. coli* a partir de 1600 pg até 0,8 pg. Neste caso, o intervalo de quantificação típico é 3,1-800 pg. As linha de calibração, as amostras, os controles e as amostras teste são aplicados ao filtro através de um procedimento baseado em vácuo *blotting*. O DNA é interligado por luz ultravioleta (UV) e depois incubado com uma sonda de DNA randomizada marcada com $_{32}$P (fósforo isótopo 32). Depois de lavado o filtro é avaliado por um instrumento de imagem de fósforo (BAS Reader da Fuji, Saitama City, Japão, www.fujimed.com). O teor de DNA das amostras é calculado usando os sinais de linha de calibração. Para cada amostra de teste, uma recuperação individual é calculada com os valores da amostra Pico, com controles de Pico e com os controles negativos (Adaptado de Wolter, 2005).

1.10.2 PCR em tempo real ou PCR quantitativo

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR), PCR quantitativa (qPCR) ou PCR em tempo real, (figura 1.5) é uma extensão da reação em cadeia da polimerase (PCR) e explora a capacidade de monitorizar o progresso de PCR tal como ocorre (em tempo real) para determinar a quantidade de DNA na reação. Os dados são recolhidos durante todo o processo para monitorar o aumento da formação do produto de PCR na fase exponencial da reação, permitindo a determinação quantitativa do total inicial de DNA em uma amostra. Uma gama de produtos químicos diferentes pode ser usada para detectar o DNA de célula hospedeira (DCH) como por

exemplo, a emissão dos compostos fluorescentes que geram um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são os SYBR® Green I corante (Molecular Probes) que se liga entre a fita dupla de DNA e que quando excitado em comprimento de onda específico emite uma fluorescência verde (Applied Biosystems) (Arya, 2005). Este ensaio é específico de uma sequência delimitada por *primers* que será reconhecida e amplificada (Wolter e Richter, 2005; Mehta e Keer, 2007).

A PCR em tempo real requer instrumentos específicos para que possa ser detectada a reação e a emissão de fluorescência, bem como programas específicos para aquisição dos dados e análise final.

A reação em cadeia de polimerização em tempo real combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. Isso permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e dando maior precisão ao processo.

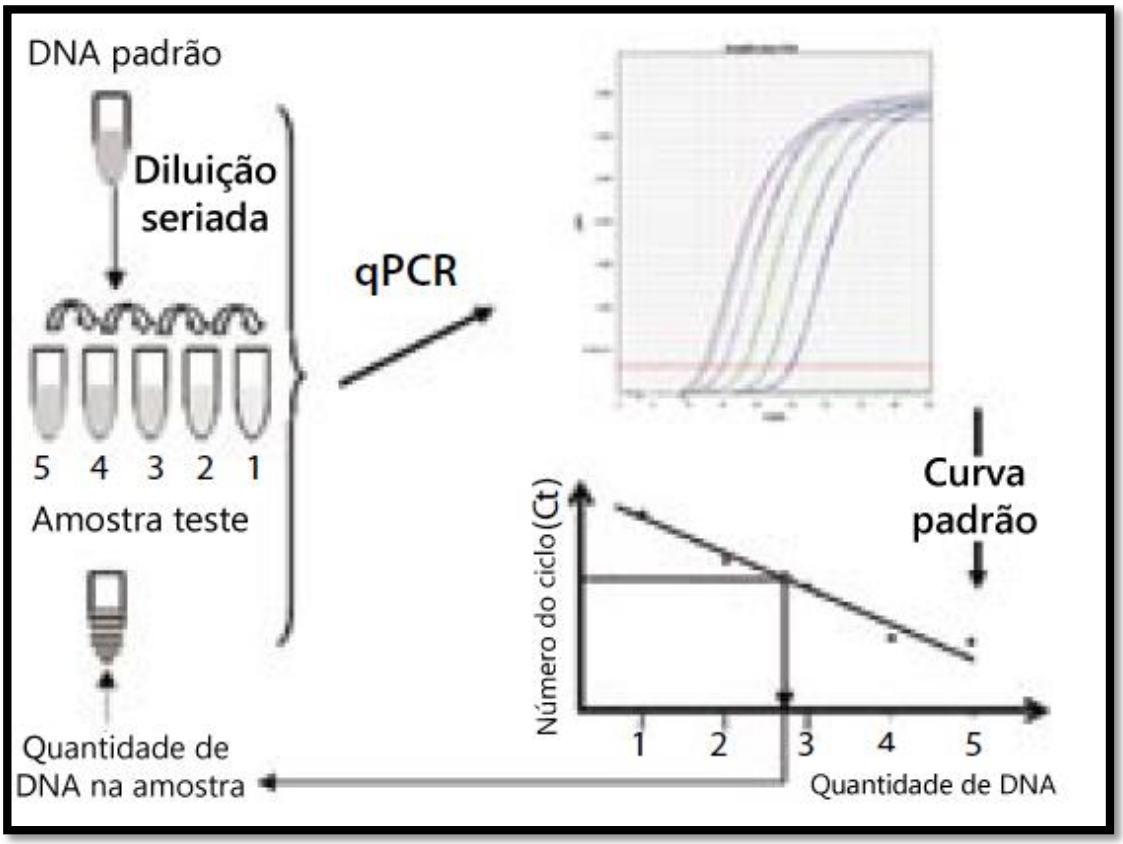


Figura 1.5: Diagrama detalhando os estágios do processo de qPCR (adaptado de Mehta e Keer, 2007**).**

1.10.3 *Threshold*

O sistema *Threshold* é uma plataforma dedicada para a quantificação rápida de produtos biofarmacêuticos ou contaminantes de biorreatores/fermentadores, processamento e controle de qualidade do produto final. O sistema é ideal para a quantificação de proteínas, peptídeos e sequência de DNA total não específico em baixas concentrações e foi desenvolvido para resolver as dificuldades em experimentos ao tentar desenvolver imunoensaios altamente sensíveis e reprodutíveis sem o uso de radioatividade. Enquanto os testes de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) são uma alternativa comum, eles são frequentemente afetados pela matriz da amostra e muitas vezes exigem um esforço de desenvolvimento significativo para atingir a saturação uniforme de anticorpos de poço para poço e placa para placa (Molecular Devices, 2011).

O ensaio *Threshold* baseia-se em uma técnica de captura na qual a proteína Ligadora de Fita Simples (SSB) biotinilada e um anticorpo anti-fsDNA (DNA fita simples) conjugado a urease ligam-se simultaneamente ao DNA de fita simples presente numa amostra. Em primeiro lugar, um complexo de reação é formado quando a proteína SSB biotinilada e o anticorpo anti-fsDNA (conjugado com urease) se ligam ao DNA de fita simples da célula hospedeira (Figura 1.6). Segue-se a uma fase de filtração, durante a qual a forte afinidade de estreptavidina por biotina é usada para capturar e concentrar os complexos de reação em uma membrana biotinilada. Após a filtração, a membrana é colocada em um leitor contendo a ureia substrato. A urease hidrolisa a uréia a NH_3 e CO_2 o que resulta numa mudança do pH que se correlaciona com a quantidade de DNA da célula hospedeira na amostra (Figura 1.7) (Wolter e Richter, 2005; Mehta e Keer, 2007).

A ligação específica de DNA durante o ensaio *Threshold* é realizada por duas proteínas de ligação de DNA, ambas as quais devem ligar-se a cada fragmento de fsDNA. Portanto, este ensaio requer fragmentos de DNA com no mínimo 600 pb (Kung, 1990) para formar um complexo de reação que produza um sinal no leitor. E este ensaio não é específico para a sequência de DNA, sendo capaz de detectar toda molécula de DNA presente dentro da especificidade de sua sensibilidade.

Em relação ao DNA total, a sensibilidade do ensaio de 2 pg pode ser alcançada. Normalmente, os ensaios tem um alcance dinâmico de 2 logs ou mais, assim, pequenas

diluições das amostras são necessárias para uma quantificação precisa. Além disso, os ensaios são rápidos e completam-se em apenas 90 segundos (Molecular Devices, 2011).

Essa sensibilidade do sistema *Threshold* se deve ao uso do LAPS (Light-Addressable Potentiometric Sensor) ou Sensor Potenciométrico Endereçador de Luz que possibilita identificar sensíveis mudanças de pH que são sinalizadas no sistema como µV/s (microvolt/segundo). O dispositivo LAPS contém uma estrutura de silício monolítico com uma superfície de detecção plana sem microcircuitos que precisa ser encapsulada. A superfície plana do sensor facilita a formação de microvolumes reprodutíveis. Em um ensaio baseado na alteração do pH causada pela atividade da enzima a diminuição do volume de ensaio para se concentrar a enzima aumenta a sensibilidade. Outra característica dos LAPS é a capacidade de múltiplas medições potenciométricas. Um dispositivo semicondutor único LAPS pode detectar várias reações químicas simultâneas, monitorando a fotocorrente induzida através da iluminação de locais discretos de sensoriamento. As determinações simultâneas de várias amostras, controles e calibradores aumentam o rendimento e a precisão do ensaio (Olson, 1990; Jia, 2012).

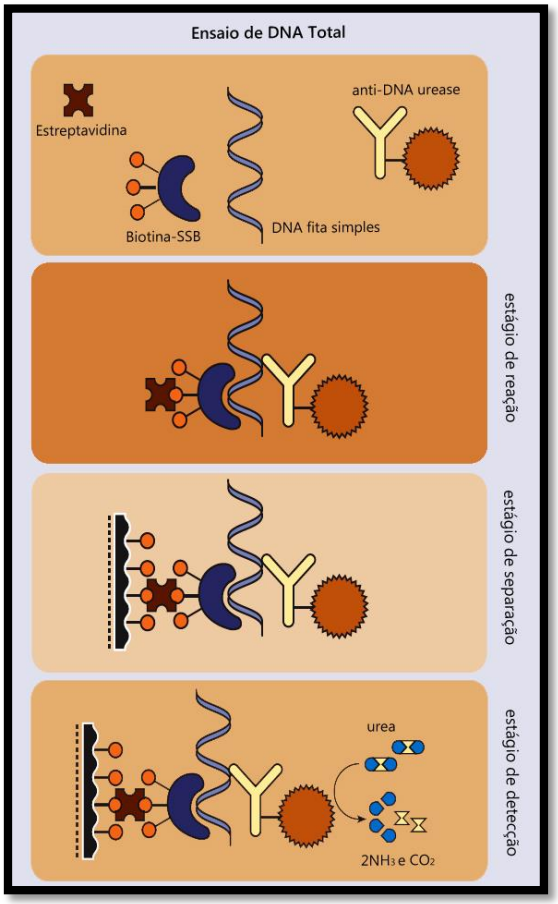


Figura 1.6: Esquema dos estágios do ensaio de DNA Total no sistema *Threshold* (Adaptado de Molecular Devices, 2011).

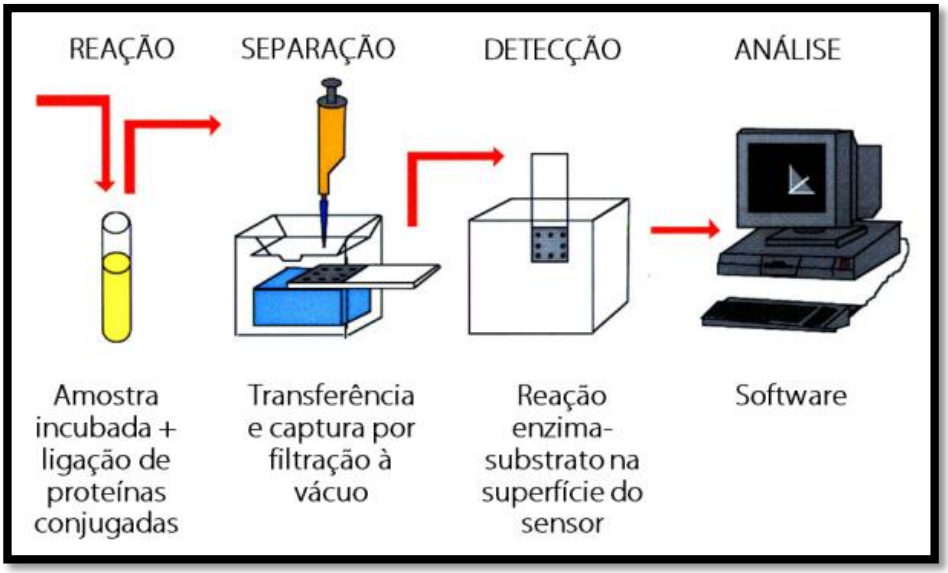


Figura 1.7: Estágios do ensaio *Threshold* (Adaptado de Molecular Devices, 2011).

1.11 - Gestão de Risco para a Qualidade

Nas últimas décadas, a palavra "riscos" vem sendo amplamente utilizada na literatura, com objetivos distintos, riscos de negócios, social, econômico, investimentos, político (Figura 1.8), mas em indústrias alimentícias e farmacêuticas, a sua aplicação está voltada para a questão de segurança alimentar e de medicamentos, estando intimamente ligada ao termo perigo (Kaplan e Garrick, 1981).

Figura 1.8: Carteira industrial de riscos (Modificado de IMA, 2007).

Segundo Santos-Reyes e Beard (2002) a segurança não é um fator isolado e o grau de segurança depende do resultado das atividades interelacionadas de pessoas, projeto da organização, gerenciamento, processo. Resumidamente, Van Schothorst (1998) define como o risco aceitável os perigos que não causam danos aos consumidores.

No uso comum, as palavras "risco" e "perigo" ou "arriscado" e "perigoso" são frequentemente usados como sinônimos. Na disciplina formal de avaliação de risco, "risco" e "perigo" têm significados específicos. Perigo é uma potencial fonte de dano (ISO/IEC 51), o qual leva à uma sequência de práticas inadequadas de fabricação que podem causar: perda ou falta de eficácia e de esterilidade, efeitos tóxicos, reações adversas e até morte dos pacientes. Em termos simples, um perigo é considerado ser a possibilidade de um efeito indesejável. Risco, no entanto, segundo a ISO/IEC 51 é a combinação do fato de que um perigo existe, a probabilidade de isso acontecer, e da gravidade das consequências ou danos que podem ocorrer.

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH) trata-se de um processo de harmonização compartilhado por EUA, Europa e Japão, refletindo as prioridades oriundas do desenvolvimento científico e tecnológico alcançado pelo setor farmacêutico e, por isso mesmo, as iniciativas tomadas em comum vêm sendo principalmente orientadas para unificar procedimentos em relação aos ensaios clínicos e à pesquisa e avaliação de novos produtos (ICH, 2010). A introdução destes últimos, nos diversos mercados, enfrentava problemas, precisamente, nas discrepâncias de critérios vigentes nos diversos países em relação aos processos de investigação e desenvolvimento das inovações farmacêuticas. O que se pretende obter a partir da harmonização de normas no campo mencionado é um fluxo mais ágil de produtos novos, sem prejuízos do trabalho de vigilância e controle, além de uma melhoria significativa na qualidade da investigação, no desenvolvimento e nos processos de avaliação dos produtos farmacêuticos (Arango, 1997).

A ICH teve início em 1990, como um projeto conjunto da indústria e das autoridades reguladoras, com o propósito de tornar o desenvolvimento do setor farmacêutico, bem como os processos de registro, mais eficientes, com melhor custo/efetividade e tendo em conta os interesses da saúde pública. Atualmente, o empreendimento tem como entidades patrocinadoras: Comissão Européia da UE, *European Federation of Pharmaceutical Industries Associations* (EFPIA), *Ministry of Health and Welfare* (Mhw) do Japão, *Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Food and Drug Administration e Pharmaceutical Research and*

Manufacturers of America (PhRMA). As exigências de natureza técnica requeridas para comprovar a eficácia, segurança e qualidade já foram quase que totalmente harmonizadas no âmbito da UE, dos Estados Unidos e do Japão. Até 2004 foram realizadas seis conferências (a cada dois anos), o que poderia ser considerada a fase inicial das atividades previstas para a Conferência, tido o termo ICH escolhido na quarta Conferência, realizada em Bruxelas, em julho de 1997. Nesta ocasião, foram definidos os princípios que deveriam orientar os tópicos a serem harmonizados, compreendendo quatro grandes categorias (Barros, 2004):

- Qualidade, relacionada a aspectos químicos e farmacêuticos.
- Segurança, englobando os estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.
- Eficácia, referente aos estudos clínicos em humanos.
- Multidisciplinar, englobando tópicos que não se enquadram nas categorias anteriores, a exemplo da terminologia médica e padrões eletrônicos para a transmissão da informação reguladora.

Para cada tema de discussão selecionado, cria-se um grupo de trabalho com um especialista representante de cada uma das entidades patrocinadoras (*Experting Working Group*). O processo de harmonização é coordenado por um Comitê (*Steering Committee*) que se reúne três vezes ao ano, coincidindo com as reuniões dos grupos de trabalho, a ele competindo decidir quais os temas que devem ser harmonizados, responsabilizando-se pelo seu seguimento com vistas a corrigir e evitar disfunções, adotando os documentos conclusivos. A estratégia adotada para atingir o processo de harmonização comporta uma série das etapas ou fases e que são as seguintes: na primeira, busca-se chegar a um acordo entre os representantes das entidades em proposta que, uma vez formulada se envia ao Steering Committee que, por sua vez, o encaminha para apreciação das agências reguladoras das três regiões; terminada a ampla consulta desencadeada na fase anterior, na fase quatro, o Comitê recomenda adoção do documento pelas três agências, seguindo-se a incorporação na legislação de cada país (Montero, 1998).

A Gestão de Riscos para Qualidade (GRQ) é um processo sistemático para a avaliação, controle, comunicação e análise de riscos para a qualidade do produto (medicamento) em todo o ciclo de vida do produto. Um modelo para a GRQ é esboçado no diagrama (Figura 1.9). Entretanto, outros modelos poderiam ser utilizados não se limitando a este esboço. A ênfase em cada um dos componentes do quadro pode ser diferente de caso para caso, mas um processo

robusto irá incorporar a consideração de todos os elementos em um nível de detalhe que seja compatível com o risco específico (ICH Q9).

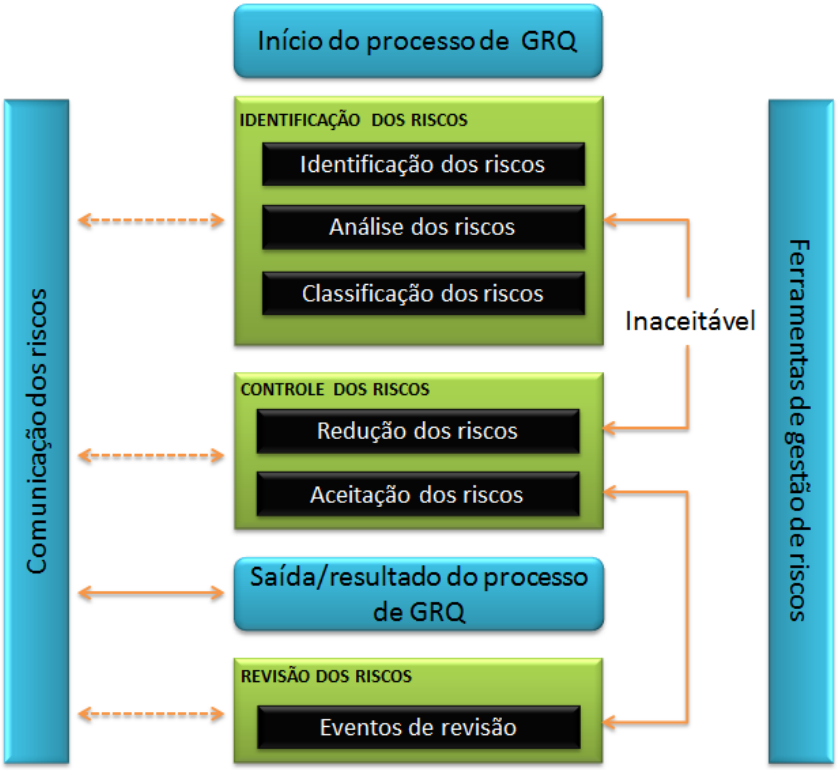


Figura 1.9: Visão geral de um típico processo de gestão de risco para qualidade (Adaptado de ICH Q9).

Um programa de gestão de risco começa com a identificação dos possíveis riscos (e benefícios) associados a um produto ou com o processo usado para desenvolver, fabricar e distribuir o produto. Segundo Griffith (2004), as seguintes perguntas devem ser feitas em cada fase do ciclo de vida do produto:

- Quais são os riscos de segurança?
- Quem está em maior risco?
- Quais populações estão em risco?
- Os riscos são previsíveis?
- Os riscos são evitáveis?

A última pergunta é muito importante porque ela forma a base do plano de intervenção. A fim de determinar se o risco é evitável, a causa raiz de cada risco tem de ser determinada. Uma vez que a causa da raiz é estabelecida, a probabilidade de ocorrência pode ser calculada e

o risco interpretado pela severidade, frequência ou duração. Seguindo à interpretação, a próxima fase, desenho e implementação de intervenções (planos de mitigação, por exemplo), podem ser iniciados (Griffith, 2004).

Conforme a CEE-63 (ABNT, 2011) todas as atividades de uma organização envolvem riscos que devem ser gerenciados. O processo de gestão de riscos auxilia a tomada de decisão, levando em consideração as incertezas e a possibilidade de circunstâncias ou eventos futuros (intencionais ou não intencionais) e seus efeitos sobre os objetivos acordados (Figura 1.9).

A gestão de riscos inclui a aplicação de métodos lógicos e sistemáticos para:

- A comunicação e consulta ao longo de todo processo;
- O estabelecimento do contexto para identificar, analisar, avaliar e tratar o risco associado a qualquer atividade, processo, função ou produto;
- O monitoramento e análise crítica de riscos;
- O relatório e registro dos resultados de forma apropriada.

Uma interpretação da interação entre os três aspectos da análise de riscos é mostrada na figura 1.10.

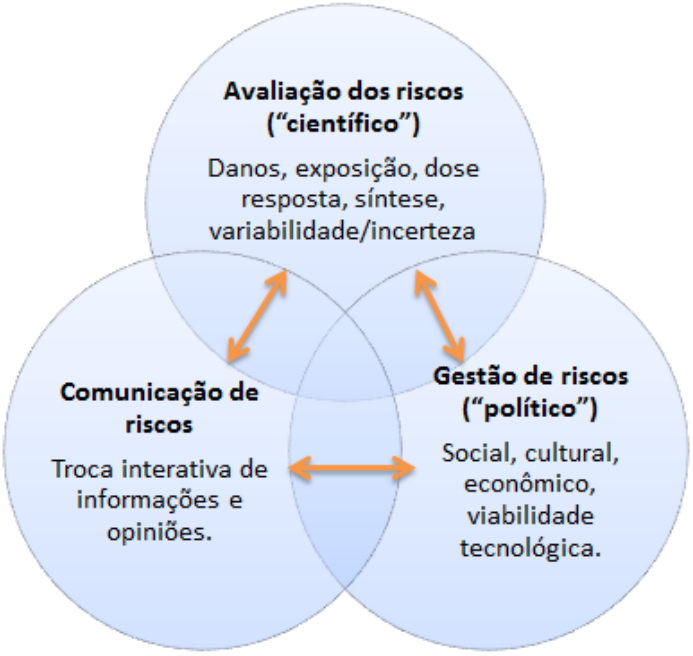


Figura 1.10: Representação esquemática da interação entre gestão de riscos, comunicação de riscos e avaliação de riscos. A avaliação de risco pode ser iniciada a partir de qualquer fonte, mas a sua conduta estará tipicamente sob o controle de um gerente de risco que vai coordenar o processo, fiscalizar o intercâmbio de informações e de transformar os resultados da avaliação em um plano de ação. O diagrama também enfatiza que o processo de análise de risco não é sequencial, mas interativo e iterativo. (Adaptado de McNab *et al.* (1998).

O processo de avaliação de riscos é a parte da Gestão de Riscos que fornece um processo estruturado para identificar como os objetivos podem ser afetados, e analisa o risco em termos de consequências e suas probabilidades antes de decidir se um tratamento adicional é requerido. O processo de avaliação de riscos tenta responder às seguintes questões fundamentais (ABNT/CEE-63, 2011):

- O que pode acontecer e por quê (pela identificação de riscos)?
- Quais são as consequências?
- Qual é a probabilidade de sua ocorrência futura?
- Existem fatores que mitigam a consequência do risco ou que reduzam a probabilidade do risco?
- O nível de risco é tolerável ou aceitável e requer tratamento adicional?

O controle de riscos inclui a tomada de decisão para reduzir e/ou aceitar riscos. O propósito do controle de risco é o de reduzir o risco para a um nível aceitável. A quantidade de esforço usado para controle de risco deve ser proporcional à importância do risco. Quem toma a decisão pode utilizar diferentes processos para compreender o nível ótimo de controle de risco, incluindo a análise de custo-benefício (Griffith, 2004; ICH Q9, 2005).

O controle de risco pode se concentrar sobre as seguintes questões (ICH Q9, 2005):

- O risco está acima de um nível aceitável?
- O que pode ser feito para reduzir ou eliminar os riscos?
- Qual é o equilíbrio adequado entre os benefícios, riscos e recursos?
- São introduzidos novos riscos como resultado do controle dos riscos identificados?

A redução do risco concentra-se em processos de sua mitigação ou prevenção à qualidade quando se excede um nível (aceitável) especificado (ver figura 1.9). A redução de risco pode incluir ações tomadas para atenuar a gravidade e a probabilidade de dano. Os processos que melhoram a detectabilidade de perigos e riscos de qualidade poderão também ser usados como parte de uma estratégia de controle dos mesmos. A implementação de medidas de redução pode introduzir novos riscos para o sistema ou aumentar o significado de outros riscos existentes. Por isso, pode ser apropriado para rever a avaliação de riscos, identificar e avaliar qualquer possível mudança dos mesmos após a implementação de um processo de redução de risco (ICH Q9, 2005).

A comunicação de risco é um processo interativo de troca de informações e opiniões sobre o risco entre avaliadores, gestores dos riscos e outras partes interessadas. É parte integrante e permanente do exercício de análise de risco e, idealmente, todos os grupos interessados devem ser envolvidos desde o início. A comunicação de risco faz com que as partes interessadas fiquem a par do processo em cada etapa da avaliação de riscos. Isso ajuda a garantir que a lógica, os resultados, a importância e as limitações da avaliação de risco sejam claramente entendidas por todas as partes interessadas (WHO, 1998).

1.11.1 Design Space

A Conferência Internacional de Harmonização em seu guia, ICH Q8 define *Design Space* como a combinação e interação multidimensional de variáveis de entrada (por exemplo, atributos de material) e os parâmetros de processo que têm sido demonstrados para fornecer garantia de qualidade.

O conceito de *Design Space* requer que um produto biotecnológico seja projetado de modo a cumprir o seu desempenho clínico desejado e o processo é projetado para entregar consistentemente um produto que atenda aos atributos de qualidade necessários para o desempenho clínico. O principal benefício de um *Design Space* aprovado é a flexibilidade regulatória, mais notavelmente o potencial para fazer melhorias de processos dentro do espaço de projeto desenhado sem supervisão regulatória permanente. Para atingir o nível necessário de conhecimento do processo, no entanto, estudos de caracterização de processo devem ser extensos e abrangerem juntamente com uma ampla gama de parâmetros do processo (Anurag et al., 2007; Garcia et al., 2008; Peterson, 2008; Yu, 2008).

Em outubro de 2006, em uma reunião do Comitê Consultivo para Ciências Farmacêuticas (Chen, 2006), as seguintes questões foram levantadas sobre o *Design Space*:

- Como o *Design Space* e o Espaço de Controle foram instituídos para cada unidade de operação?

- O *Design Space* de cada unidade de operação é independente de projeto de equipamentos e tamanho de lote?

- Como o Espaço de Controle se relaciona com o *Design Space*?

- Como o relacionamento do Espaço de Controle com as faixas operacionais varia no registro do lote Mestre (fórmula mestre)?

O *Design Space* para medicamentos genéricos foi estabelecido em lotes de pequena escala utilizando planejamento de experimentos (DOE – *Design Of Experiments*) e conhecimento prévio, e deve ser verificada em escala comercial. O *Design Space* depende do princípio de projeto dos equipamentos e tamanho do lote. O Espaço de Controle (ou faixas de operação normal) é definido como o limite superior e/ou inferior para os atributos críticos de matéria-prima e para os parâmetros de processo, entre os quais o parâmetro e materiais são rotineiramente controlados durante a produção a fim de garantir a reprodutibilidade. O Espaço de Controle deve estar dentro do *Design Space*. Se o espaço de controle for muito menor do que o *Design Space*, o processo é então considerado robusto. Caso contrário, um rigoroso controle de processo pode ser necessário para assegurar que o mesmo pode ser operado constantemente dentro do *Design Space* (Yu, 2008).

A criticidade determina quais atributos de qualidade e parâmetros de processo são definidos no *Design Space*. O *Design Space* define a relação entre Atributos Críticos de Qualidade (CQAs – *Critical Quality Attributes*) e Parâmetros Críticos do Processo (CPPs – *Critical Process Parameters*), e identifica faixas de operação aceitável para CPPs. É a região onde o produto aceitável pode ser produzido (Figura 1.11). A faixa normal de operação é um subconjunto do *Design Space*, onde a produção rotineira é tipicamente realizada em uma base diária. Finalmente, a Estratégia de Controle assegura que a operação do processo seja mantida no *Design Space*. A intenção é evitar operar nas regiões limites conhecidas do processo ou nas regiões que se sabe que causam falhas no produto (Garcia et al., 2008).

Há muitos meios cientificamente justificáveis para alcançar um *Design Space*. A abordagem a qualquer projeto específico pode aproveitar qualquer combinação de ferramentas, dependendo da tecnologia específica que está sendo avaliada, da literatura disponível, da experiência corporativa interna e do nível de conforto. O *Design Space*, especialmente quando ligado a uma estratégia de controle estruturada e a uma avaliação da criticidade, tem o potencial de mudar aspectos de interações reguladoras fornecendo dados e contextos, enquanto continua a fornecer um alto nível de garantia de qualidade e desempenho farmacêutico (Lepore e Spavins, 2008).

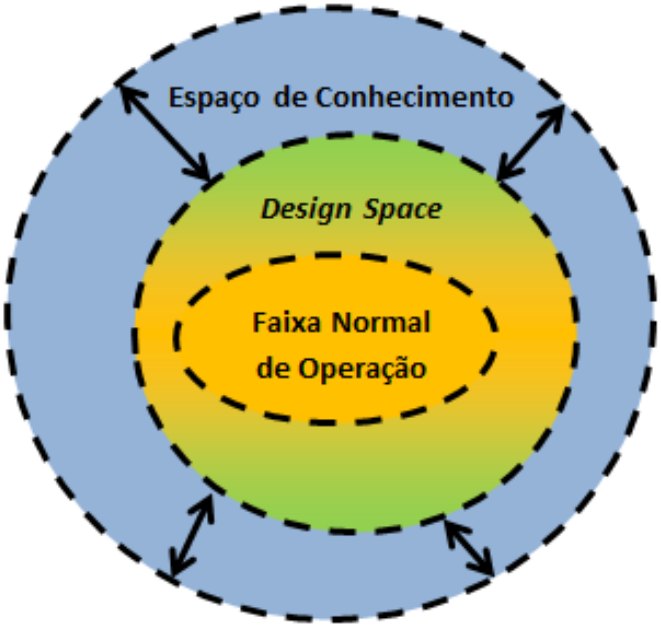


Figura 1.11: Ligação entre Espaço de Conhecimento, *Design Space* e Faixa Normal de Operação (Adaptado de Garcia; Cook; Nosal, 2008).

1.11.2 Ferramentas de Análise de Risco

A gestão de riscos para qualidade apoia uma abordagem científica e prática para a tomada de decisões. Ela fornece métodos documentados, transparentes e reprodutíveis para realizar as etapas do processo de qualidade de gestão de risco com base no conhecimento atual sobre a avaliação da probabilidade, gravidade e às vezes detectabilidade do risco. Tradicionalmente, os riscos para a qualidade foram avaliados e gerenciados em uma variedade de meios informativos (procedimentos empíricos e/ou interno) com base em, por exemplo, compilação de observações, tendências e outras informações. Essas abordagens continuarão a fornecer informações úteis que possam apoiar temas como tratamento de reclamações, defeitos de qualidade, desvios e alocação de recursos (ICH Q9, 2005).

Além disso, a indústria farmacêutica e os reguladores podem avaliar e gerenciar riscos utilizando ferramentas de gestão de risco reconhecidos e/ou procedimentos internos (ICH Q9, 2005).

- ***Fault Tree Analysis* – FTA** (Análise da Árvore de Falhas)
- ***Failure Mode Effects Analysis* – FMEA** (Análise de Modo e Efeitos de Falha)

- ***Failure Mode, Effects and Criticality Analysis* – FMECA** (Análise da Criticidade de Modo e Efeitos de Falha)
- ***Hazard Analysis and Critical Control Points* – HACCP** (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle)
- ***Preliminary Hazard Analysis* – PHA** (Análise Preliminar de Perigos)
- ***Hazard Operability Analysis* – HAZOP** (Análise de Perigos de Operabilidade)
- ***Risk Ranking and Filtering*** (Eleição e Ponderação do Risco)

O quadro 1.3 mostra o detalhamento de cada uma das ferramentas utilizadas nas metodologias de avaliação de risco.

Quadro 1.3: Metodologias mais comuns de análise de risco (Modificado de LabCompliance, 2010).

	FTA	FMEA/ FMECA	HACCP	PHA	HAZOP	RISK RANK AND FILTERING
PRINCÍPIO	Gráfica, dedutiva, ferramenta estruturada.	Ferramenta indutiva estruturada. Pode ser qualitativa e quantitativa.	Prevenir os riscos conhecidos para reduzi-los nos pontos de controle específicos.	Ferramentas indutivas qualitativas.	Identificação de todos os desvios acreditáveis que possam conduzir a eventos perigosos ou a problemas operacionais.	Elege e pondera riscos avaliados quantitativamente em conjunto com outros avaliados qualitativamente.
VANTAGENS	Uso de diagrama de árvore de falha com símbolos padronizados que mostram o caminho desde o evento básico até o evento indesejado.	Universal e pode-se fazer uso de escala, por exemplo, para alto nível e avaliação detalhada do risco.	Processo de gestão integral de riscos. Específica e flexível. Foco na prevenção. Manutenção de registros para questões de conformidade e responsabilidade do produto.	Facilmente adaptável à maioria das situações.	Sistematicidade, flexibilidade e abrangência de perigos e problemas operacionais. Maior entendimento do funcionamento da unidade	Aceita alto grau de complexidade. Flexível. Faz uso de escala para incluir múltiplos fatores de risco. Pode ser usado com uma variedade de critérios de avaliação quantitativos e qualitativos
LIMITAÇÕES	Pode tornar-se muito complexa por focar em uma falha de cada vez.	Ferramentas não consideram questões operacionais ou de desempenho do operador. Não mostra a interação entre os eventos.	Requer informações detalhadas sobre produtos e processos.	Relativamente desestruturada, portanto pode deixar escapar perigos potenciais.	Avalia apenas as falhas de processo para determinar as potenciais anormalidades de engenharia. Requer uma equipe multidisciplinar com larga experiência para implementação da técnica.	Pode exigir um esforço significativo para estabelecer fatores e critérios de risco. Pode exigir um esforço significativo para desmembrar o risco em muitos fatores. Pode ser difícil correlacionar diretamente com riscos absolutos.

	FTA	FMEA/ FMECA	HACCP	PHA	HAZOP	RISK RANK AND FILTERING
FERRAMENTAS	Gráficos com símbolos padronizados. Software dedicado recomendado.	Tabelas.	Diagrama de processo detalhada. Tabelas	Desenhos e tabelas	Uso apropriado de um conjunto de palavras guias aplicadas a pontos críticos do sistema em estudo.	Software dedicado recomendado.
CARACTERÍSTICA DO MÉTODO	Qualitativo.	Qualitativo/ Quantitativo.	Qualitativo/ Quantitativo.	Qualitativo.	Qualitativo.	Qualitativo.
PRINCIPAL APLICAÇÃO DE USO	Usado para definir um determinado evento indesejado e identificar as suas causas (eventos básicos). Para problemas potenciais com sérios impactos.	Uso universal, por exemplo, para dispositivos médicos, industriais. Utilizado para identificar potenciais modos de falha e impacto nos processos, instalações e equipamentos. Utilizado durante projeto e operação.	Alimentos e indústria química. Adaptado para a indústria farmacêutica pela OMS. Cobrir a cadeia completa do produto.	Utilizada no início de novos produtos e mudanças em produtos e processos (fase de projetos) Indústria química. Primeira etapa de avaliações de riscos complexos.	Fase inicial do projeto. Revisão geral de segurança de unidades em operação. Modificações de unidades de processo já em operação.	Esta ferramenta é usada para indicar as áreas que devem ser priorizados numa inspeção/auditoria.

Pode ser adequado adaptar essas ferramentas para uso em áreas específicas relativas à qualidade do produto em relação à droga (substância) e ao medicamento. Métodos de Gestão de Risco para a Qualidade e as ferramentas de apoio estatísticas podem ser utilizados em combinação. O uso combinado proporciona flexibilidade que pode facilitar a aplicação de princípios da Gestão de Risco para a Qualidade. O grau de rigor e formalidade da gestão de risco à qualidade deve refletir o conhecimento disponível e ser proporcional à complexidade e/ou grau de importância da questão a ser abordada (ICH Q9, 2005).

As seguintes áreas são identificadas como potencial na indústria farmacêutica para a qualidade da aplicação de gestão de risco (Prasad, 2011):

1. Documentação [POPs, lote registros etc.]
2. Treinamento [Horários e eficácia]
3. Defeitos de qualidade [Reclamações, desvios, sistema operacional online, etc.]

4. Auditorias [Conformidade]
5. Revisões periódicas [Avaliação de revalidação]
6. Alterar controles [Avaliação do impacto]
7. Relatórios de desenvolvimento [Verificação de processo e controles]
8. Instalações, equipamentos e utilitários [componentes, manutenção, etc.]
9. Gerenciamento de materiais [recepção, armazenagem e distribuição]
10. Embalagem e rotulagem [sistema de fechamento e rotulagem de embalagem]

O uso de uma abordagem baseada no risco fornece um método consistente para a tomada de decisão que foi facilmente associada com a alocação de recursos e garantia da segurança do paciente. Em última análise, aplicação de gestão de risco para a indústria farmacêutica deve reduzir o número de ameaças ou minimizar o seu impacto através da utilização consistente das ferramentas/métodos e revisão periódica. As informações produzidas como resultado da operação da gestão de risco auxilia a organização a atender seus objetivos definidos (Prasad, 2011). É importante ressaltar que a Gestão de Risco para a Qualidade dos produtos não se limita aos 10 itens abordados, uma vez que diferentes setores da indústria farmacêutica podem incorporar os conceitos e ferramentas para melhor entenderem seus processos, e os possíveis riscos em suas atividades seja de produção, de controle de qualidade ou gestão.

1.11.3 HACCP

Para este trabalho será utilizada a ferramenta Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, por se entender que os PCC (Pontos Críticos de Controle) podem ser de grande valia para a comparação de metodologias analíticas. E a partir das avaliações, tomar decisões que por vezes podem envolver compra de equipamentos, software, recursos humanos, etc.

Tradicionalmente, a metodologia Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) tem sido considerada como um sistema de gestão de segurança. Tem como objetivo prevenir os perigos conhecidos e reduzir os riscos que podem ocorrer em pontos específicos de diferentes setores. Tais princípios estão sendo cada vez mais aplicados em indústrias, tais como a indústria automobilística, de aviação, na indústria química e biofarmacêutica (WHO, 2007).

Os perigos que afetam a qualidade são controlados em certa medida por meio da validação das operações críticas e dos processos na produção de produtos farmacêuticos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF). No entanto, as BPF não abrangem a segurança dos

funcionários envolvidos na produção, enquanto ambos os aspectos são abordados pelo HACCP (WHO, 2007).

Os procedimentos, incluindo as BPF, abordam as condições operacionais e fornecem a base para o HACCP. O HACCP é um método sistemático para a identificação, avaliação e controle dos riscos de segurança. A ferramenta HACCP é um sistema de gestão em que a segurança é abordada através da análise e controle de perigos químicos, biológicos e físicos originados da aquisição de matérias-primas, produção e manuseio, à fabricação, distribuição e consumo do produto acabado (FDA, 2011). É uma técnica racional e dinâmica, recomendada pelo comitê de especialistas da WHO (2003), embasada na aplicação de princípios técnicos e científicos de prevenção, que representa uma atitude pró-ativa e cujos ideais encontram-se em concordância com as disposições das BPF (Bansal, 2004).

As BPF para produtos farmacêuticos requerem a validação dos processos críticos bem como de alterações no processo de fabricação que podem afetar a qualidade do produto final. A experiência mostra que a maioria dos processos de fabricação contêm etapas que são "críticas" do ponto de vista de variações na qualidade do produto final (WHO, 2007).

O HACCP não deve ser confundido com validação, uma vez que a sua abordagem é mais ampla. Assim, ajuda a identificar questões sobre as quais a validação deve se concentrar. É baseada na ciência e sistemática, e identifica perigos específicos e medidas para seu controle, bem como fornece informações sobre proteção ambiental e segurança do trabalho. É uma ferramenta para avaliar perigos e estabelecer sistemas de controle focados na prevenção em vez de depender de ações corretivas baseadas nos testes de produto final. Todos os sistemas de HACCP são capazes de acomodar alterações, tais como avanços no desenho de equipamentos e procedimentos de processamento ou desenvolvimentos tecnológicos (WHO, 2007; FDA, 2011).

O HACCP não deve substituir a BPF, no entanto, a sua aplicação pode ser utilizada como um primeiro passo para se trabalhar com BPF.

Em países onde são aplicadas regulações apropriadas de conformidade, com atividades BPF (incluindo validação) e inspeções, se fornecem garantias de que os riscos são amplamente controlados. Em outros países onde a ação dos órgãos reguladores é menos eficaz, no entanto, os pacientes podem ser colocados em risco devido à produção de produtos farmacêuticos de

baixa qualidade, eficácia e segurança. A avaliação dos riscos individuais relacionados com produtos específicos e matérias-primas, bem como o reconhecimento de perigos em fases específicas da produção ou distribuição deve permitir que as autoridades reguladoras melhorem o controle de medicamentos, aumentando a eficácia de suas atividades dentro dos limites dos recursos disponíveis (WHO, 2007).

Esse sistema é contínuo, detectando-se os problemas antes que ocorram, ou no momento em que surgem, e aplicando-se imediatamente as ações corretivas. Além disso, é uma ferramenta sistemática, por ser um plano completo que cobre todas as operações, os processos e as medidas de controle, diminuindo a chance de ocorrência de perigos.

O HACCP é compatível com outros sistemas de controle de qualidade (WHO, 1997). Isto significa que inocuidade, qualidade e produtividade podem ser abordadas em conjunto, resultando em benefícios para os consumidores, como maior confiança, mais lucros para as empresas, e melhores relações entre os que trabalham em função do objetivo comum de garantir a qualidade, eficácia e segurança dos produtos.

A implementação do sistema HACCP reduz a necessidade de inspeção e teste de produto final, aumenta a confiança do consumidor e resulta num produto comercialmente mais viável. Isso facilita o cumprimento de exigências legais, e permite o uso mais eficiente de recursos, acarretando redução nos custos da indústria.

1.12 – Relevância do estudo

O mercado de produtos biofarmacêuticos tende à uma globalização de metodologias de produção e controle de qualidade, bem como de requisitos regulatórios para que os produtos sejam produzidos e controlados com o mesmo nível de qualidade, eficácia e segurança. As diretrizes do ICH para os Requisitos Técnicos de Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano preconizam na sua categoria de qualidade uma série de Guias orientativos que visam enfocar de forma sistemática a gestão de riscos para a qualidade, facilitando o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e outros requisitos de qualidade.

As diferentes ferramentas de Gestão de Risco para Qualidade procuram focar na especificação de parâmetros que realmente impactem na segurança e eficácia do produto e que estas avaliações devem basear-se em conhecimento científico, traduzido por dados.

As novas metodologias analíticas que procuram a eficácia de dados mais acurados e com a velocidade de resposta esperada pelos produtores têm uma similaridade com a validação de processos e com a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. Permitindo que os ensaios analíticos sejam desenhados dentro de um *Design Space* que preconiza os limites pré-definidos de parâmetros de processo que demonstraram a segurança para a qualidade do produto.

O ensaio mais comum para a detecção de DNA contaminante em biofármacos, faz uso de material radioativo, o que não é mais realizado no Instituto. Isso se deve, principalmente às normas exigidas pela CNEN, que envolve uma burocracia para a concessão de registro de pessoal hábil para lidar com esse tipo de material, além de treinamentos, transporte e descarte do material radioativo, que tornaria o trabalho, de uma forma geral, muito árduo.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Utilizar a ferramenta de análise de risco, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) para estabelecer um critério de escolha para uma metodologia alternativa para o controle de qualidade do biofármaco alfainterferona 2b e uma melhor exatidão e/ou precisão com relação ao método atual preconizado pela farmacopeia, que utiliza material radioativo em seu ensaio.

2.2 - Objetivos específicos

- Promover a inovação das atividades do controle de qualidade inserindo os conceitos de gerencimento de risco no Departamento de Controle de Qualidade - DEQUA em Bio-Manguinhos.
- Possibilitar uma melhor escolha, fundamentada em dados, de uma metodologia alternativa para o controle de qualidade do biofármaco alfainterferona 2b tendo como base os pontos críticos de controle e visando seus riscos potenciais.
- Avaliar, controlar e aprimorar as metodologias mais refinadas envolvendo ensaios de biologia molecular.
- Propiciar um ensaio quantitativo, para ir além da expectativa do ensaio preconizado pela farmacopeia focando o biofármaco alfainterferona 2b.

3 – METODOLOGIA

A proposta foi baseada em um estudo de caso que trata de um processo específico para o desenvolvimento de uma metodologia alternativa para o controle de qualidade do biofármaco Alfainterferona 2b. É um desenho do desenvolvimento de uma metodologia que pode ser conduzido no quadro de paradigmas bem distintos, como o positivista, o interpretativo ou o crítico (Kilpatrick, 1988). Assume-se o desenvolvimento de forma a descobrir o que há de mais essencial e característico na situação em estudo. Essa metodologia utiliza uma grande variedade de instrumentos e estratégias de colheita de dados. Tem um forte cunho descritivo que conduz a um profundo alcance analítico, além de procurar identificar padrões e não testar hipóteses. O analista é o principal instrumento de colheita de dados e na interpretação dos mesmos (Cohen; Manion; Morrison, 2000).

O método de estudo de caso abrange todo o conjunto de procedimentos necessários para fazer um estudo de caso. Essas tarefas incluem projetar o estudo, coletar os dados do estudo, analisar os dados e apresentar os relatórios e resultados (Yin, 2011). Esta metodologia permite descrever e avaliar situações quando as questões de pesquisa são do tipo “como” e “por que”, em que o pesquisador não tem controle sobre o evento e busca ampliar seu conhecimento acerca de determinado tema. Podem ser apontadas pelo menos seis fontes de evidências em um estudo de caso: documentos, arquivos de registros, entrevistas, observação direta, observação de participantes e artefatos físicos (Stake, 1995; Tellis, 1997; Yin, 2008).

Os fundamentos deste delineamento baseiam-se na idéia de que a análise de uma unidade de determinado universo possibilita a compreensão da sua generalidade, ou, pelo menos, o estabelecimento de bases para uma investigação posterior. O estudo de caso é bastante utilizado em pesquisas exploratórias por sua flexibilidade, sendo aplicado com pertinência às situações em que o objeto de estudo já é suficientemente conhecido a ponto de ser enquadrado em determinado tipo ideal (Gil, 1995).

As técnicas utilizadas para determinar DNA contaminante no biofármaco Alfainterferona 2b são normalmente abordadas segundo duas perspectivas: Avaliação Qualitativa (Hibridização

com sonda radioativa – Análise dot blot) e Avaliação Quantitativa (qPCR e tecnologia usando biosensor como o *Threshold*) (USP, 2009). Primeiramente foi feita uma pesquisa dos métodos, assim como um estudo de seus protocolos para se obter um embasamento científico dos mesmos com intuito de dar suporte à utilização da ferramenta de análise de risco HACCP.

Dessa forma, o trabalho foi composto de cinco fases distintas e subsequentes:

1ª fase: foi realizado um levantamento e revisão bibliográfica acerca dos assuntos contemplados pela proposta de trabalho e etapas presentes ao longo de todo o processo de elaboração da dissertação.

2ª fase: as metodologias em estudo foram representadas a partir do desenho de seus respectivos fluxogramas.

3ª fase: a partir dos fluxogramas da etapa anterior, foi desenhado um diagrama de causa e efeito das possíveis fontes de variabilidade nos ensaios de quantificação de DNA de célula hospedeira (DCH).

4ª fase: nesta fase implementou-se o HACCP.

5ª fase: foram elencados os pontos críticos de controle (PCC).

6ª fase: interpretação e comparação dos PCC entre os métodos.

3.1 – 1ª fase: Levantamento bibliográfico

Inicialmente, foi realizado um levantamento e revisão bibliográfica acerca dos assuntos contemplados pela proposta de trabalho e etapas presentes ao longo de todo o processo de elaboração da dissertação. Nesta fase, foram estudados os fundamentos teóricos do gerenciamento de riscos à qualidade, tendo como base fundamental o documento Quality Risk Management - Q9, do ICH (2005).

A coleta de dados dos ensaios para detecção de DNA contaminante se deu por meio de POPs, protocolos científicos, manuais de instrução de fabricantes, farmacopeias, além de análises no Departamento de Qualidade de Bio-Manguinhos (DEQUA).

Para a construção dos fluxogramas e diagramas foram utilizados os guias e especificações de legislações nacionais e internacionais, além de instruções de trabalho.

3.2 – 2ª fase: Desenho de fluxogramas

Para a aplicação da ferramenta de análise de risco, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) se fez necessário o uso de análises mais específicas que permitiram elencar os pontos críticos de cada técnica avaliada. Os desenhos de fluxogramas são representações típicas de um processo que permite dividi-lo em suas etapas, facilitando a observação técnica.

3.3 – 3ª fase: Desenho de diagramas de causa e efeito

O Desenho de Diagrama de Causa e Efeito permitiu identificar e organizar as possíveis causas, além de associar várias possíveis causas com um único efeito, o que possibilitou distinguir a criticidade de um evento/modo de falha.

3.4 – 4ª fase: implementação do HACCP

Nesta etapa foi realizada a implementação do sistema de HACCP seguindo os seguintes passos:

1. Construção do fluxograma comparativo das técnicas
2. Confirmação do local de instalação dos equipamentos
3. Listagem de todos os perigos, analise dos riscos e consideração dos controles necessários;
4. Determinação dos pontos críticos de controle (PCC);
5. Estabelecimento dos limites críticos para todos os PCC;
6. Estabelecer documentação e manter registros.

Os passos 5 e 6 deverão ser completamente implementados após a validação do(s) ensaio(s) para detecção de DNA de célula hospedeira.

3.5 – 5ª fase: elencar PCC

Um dos princípios do Sistema HACCP é a identificação dos PCC. O PCC é qualquer ponto, etapa ou procedimento no qual se aplicam medidas de controle (preventivas), para

manter um perigo significativo sob controle, com objetivo de eliminar, prevenir ou reduzir os riscos inerentes ao processo.

As Boas Práticas de Fabricação adotadas como pré-requisito do Sistema HACCP, são capazes de controlar muitos dos perigos identificados (Pontos de Controle – PC); porém, aqueles que não são controlados (total ou parcialmente) através dos programas de pré-requisitos devem ser considerados pelo Sistema HACCP.

Os PCC são os pontos caracterizados como realmente críticos à segurança. As ações e esforços de controle dos PCC devem ser, portanto, concentrados. Assim, o número de PCC deve ser restrito ao mínimo e indispensável. É interessante assinalar que mais de um perigo pode ser controlado em um mesmo PCC, ou que mais que um PCC pode ser necessário para controlar um único perigo (SENAI, 2000).

A partir daí são estabelecidos os limites críticos de todos os PCC. O limite crítico é um valor máximo e/ou mínimo de parâmetros biológicos, químicos ou físicos que assegure o controle do perigo. Os limites críticos são estabelecidos para cada medida preventiva monitorada dos PCC. Estes valores podem ser obtidos de fontes diversas, tais como: guias e padrões da legislação, literatura, experiência prática, levantamento prévio de dados, experimentos laboratoriais que verifiquem adequação e outros. Os limites críticos devem estar associados a medidas como: temperatura, tempo, atividade de água, pH, acidez titulável, resíduos de antibióticos e outras. Pode-se, também, estabelecer limites de segurança com valores próximos aos limites críticos e adotados como medida de segurança para minimizar a ocorrência de desvios nos limites críticos.

Uma estratégia utilizada para facilitar a identificação de cada PCC é uma árvore de decisão PCC (Figura 4.1). Embora a aplicação da árvore de decisão PCC possa ser útil para determinar se um passo particular é um PCC para um perigo previamente identificado, é meramente uma ferramenta e não um elemento obrigatório da HACCP. Uma árvore de decisão PCC não é um substituto para o conhecimento de especialistas (FDA, 1997).

Assim sendo, cada método de identificação de DNA contaminante estudado teve, após o estudo dos mesmos e a partir dos respectivos fluxogramas, seus PCC identificados no intuito de se avaliar, confrontar e comparar os riscos de cada um.

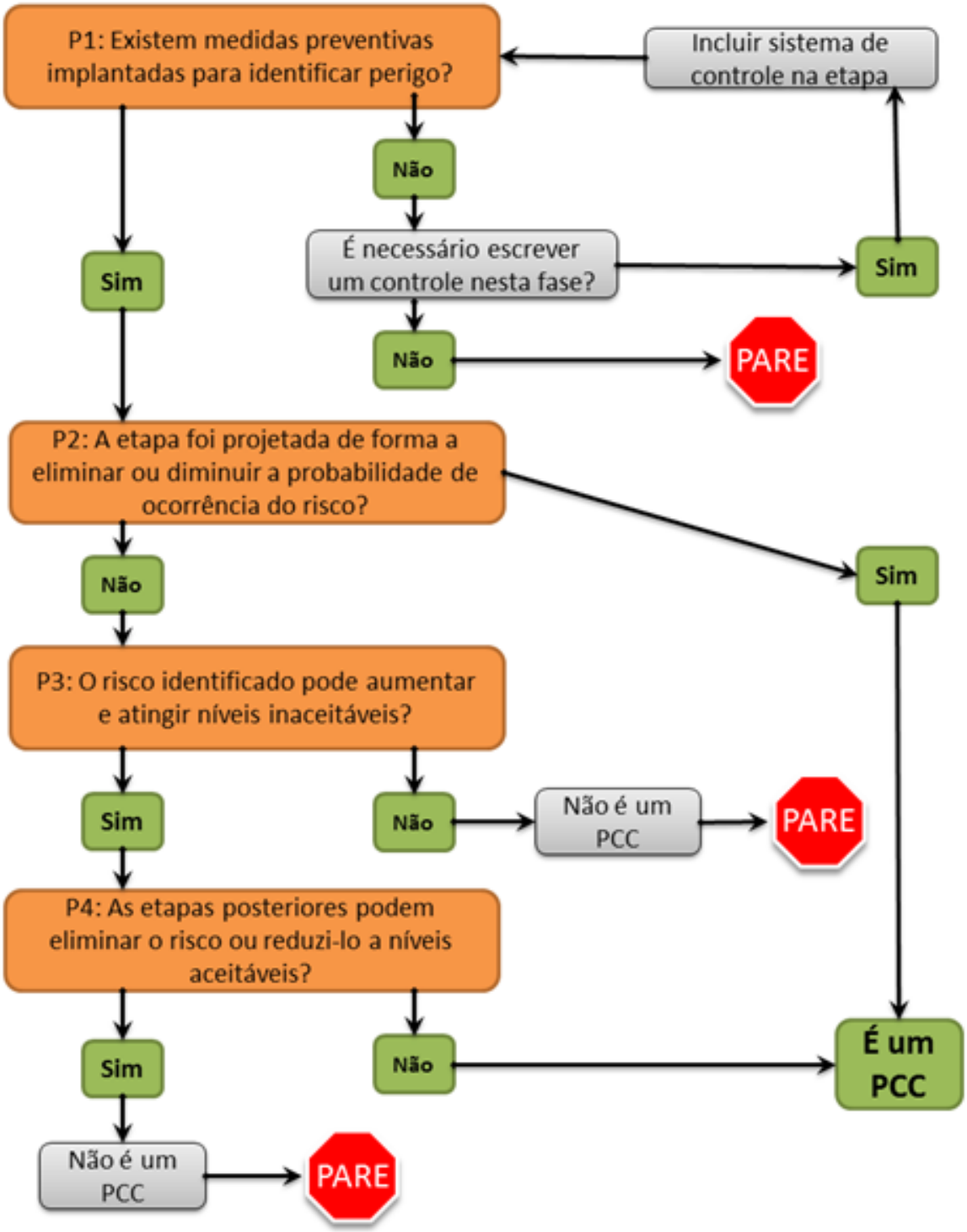


Figura 3.1: Árvore de perguntas para determinação dos PCC (Adaptado de FAO/WHO, 1997).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentadas as planilhas para análise dos dados elencados durante o processo de estudo de caso, que consistem basicamente do entendimento dos processos – aqui representados pelas metodologias e seus respectivos equipamentos, do diagrama de causa e efeito e, por fim, do levantamento e análise dos pontos críticos de controle.

A estratégia de colheita de dados como fontes de evidência para este estudo foram os documentos, as entrevistas, a observação direta e a observação de especialistas que trabalham diretamente com as técnicas, porém com outros objetivos.

4.1 – Fluxogramas

Os fluxogramas fornecem uma vista detalhada do processo e aumentam a compreensão de como o processo ocorre. Com um fluxograma de processo, as equipes podem identificar passos repetitivos, gargalos e ineficiências no processo (McDermott et al., 2008). Quando usados com uma ferramenta de análise de risco, como o HACCP, os fluxogramas aumentam o entendimento da equipe sobre determinado processo, o que por sua vez facilita identificar possíveis falhas, efeitos e soluções (McDermott et al., 2008; Tague, 2010). A partir disso, foram pesquisados e desenhados, primeiramente, os fluxogramas dos três ensaios: dot-blot radiotivo (Figura 4.1), qPCR (Figuras 4.2; 4.3; 4.4; 4.5 e 4.6) e *Threshold* (Figuras 4.7; 4.8; 4.9 e 4.10).

Os fluxogramas foram confeccionados em separado a partir de cada uma das etapas dos ensaios de qPCR e *Threshold*. Por opção, o mesmo não aconteceu com o dot-blot radioativo para facilitar sua visualização como um todo, por não ser o foco do trabalho e sim servir de comparação para os ensaios alternativos analisados, uma vez que esta metodologia não tem condições de ser implantada em Bio-Manguinhos, conforme mencionado anteriormente. Contudo, o mesmo foi separado em suas diferentes etapas para verificação dos perigos, para o levantamento dos seus PCC e para verificar se os mesmos pontos se repetem nas metodologias

alternativas, com isso, poderíamos verificar se o escopo de abrangências dos diferentes ensaios metodológicos são compatíveis (ver subitens 4.3 e 4.4).

O fluxograma foi testado acompanhando processos semelhantes com outras finalidades, usando desta vez o quadro como um guia. Vale ressaltar que tanto os ensaios de qPCR e *Threshold* podem ser aplicados com diferentes finalidades na rotina do controle de qualidade para produtos terminados que não especificamente para o caso de detecção de DNA de células hospedeiras – DCH.

Todo o fluxograma definido para um processo deve ser revisto periodicamente para se ter certeza de que é mantido atualizado (McDermott et al., 2008). Vale lembrar que este fato é importante para quaisquer processo/ensaio validados e utilizados periodicamente, seja no controle de qualidade ou na produção. Nesse trabalho, os fluxogramas foram analisados por profissionais que tem experiência nos respectivos ensaios, sejam do desenvolvimento, qualidade ou produção.

Fluxograma Dot-Blot para Alfainterferon 2B

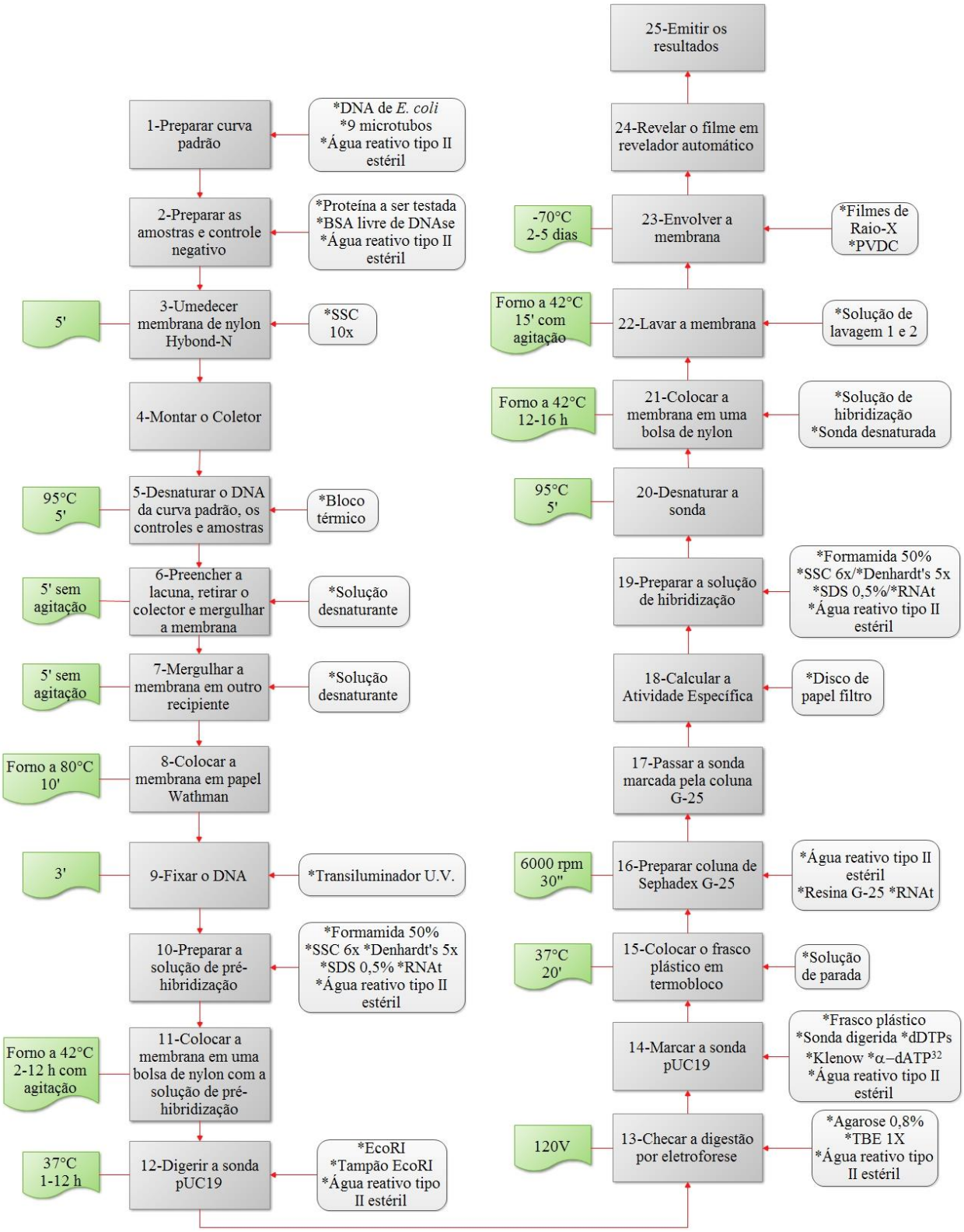


Figura 4.1: Fluxograma do ensaio de dot-blot radioativo geral.

Fluxograma qPCR - Extração de DNA residual (*PrepSEQ™ Residual DNA Sample Preparation Kit - Applied Biosystems*)

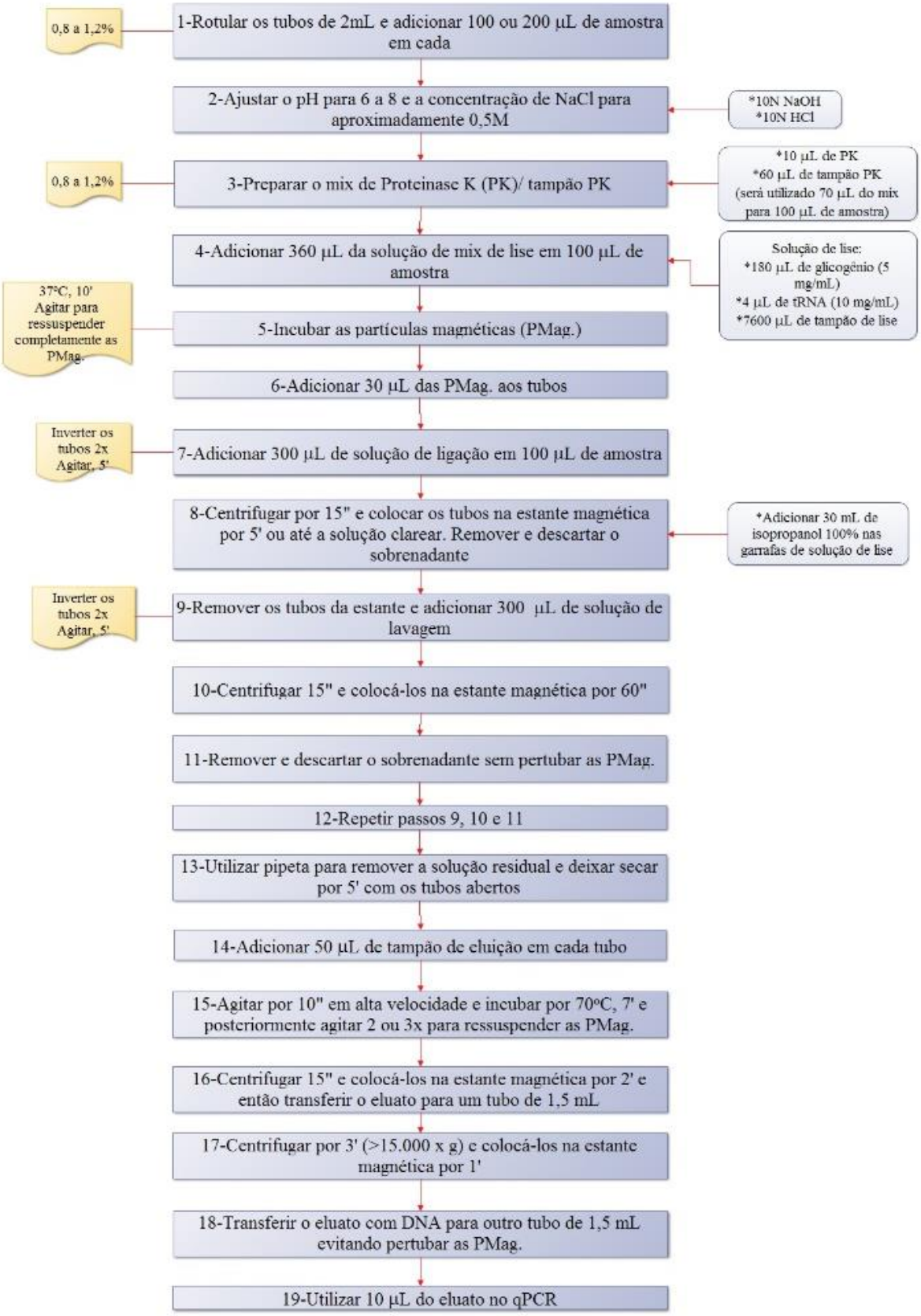


Figura 4.2: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa de extração de DNA.

Fluxograma qPCR - Preparo do Mix Master da reação
(*resDNASEQ™ Quantitative DNA kit- Applied Biosystems*)

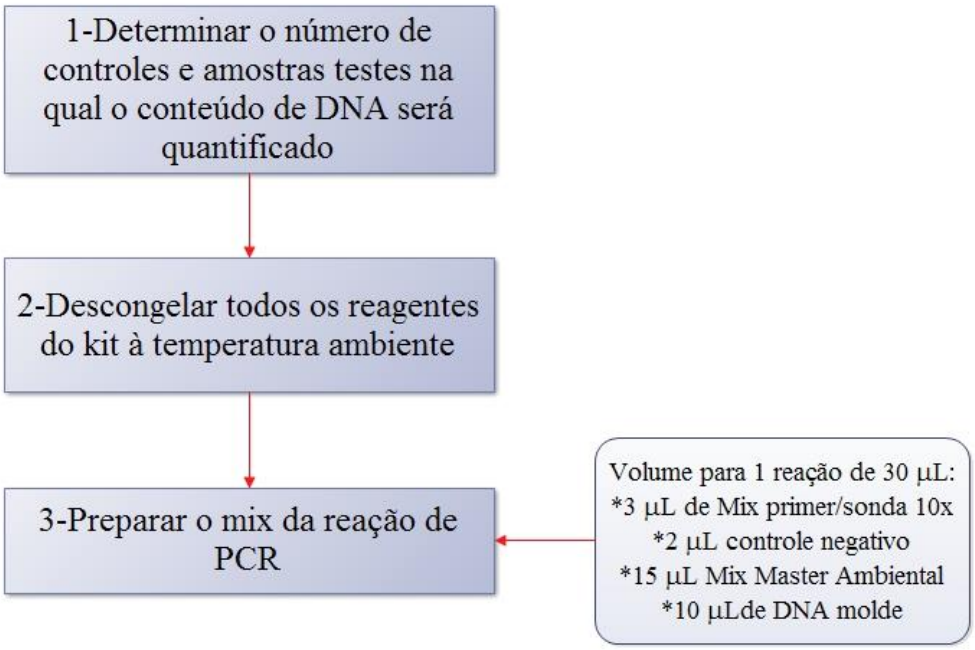


Figura 4.3: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa de preparo do mix máster da reação.

Fluxograma qPCR - Preparo da curva padrão (*PrepSEQ™ Residual DNA Sample Preparation Kit - Applied Biosystems*)

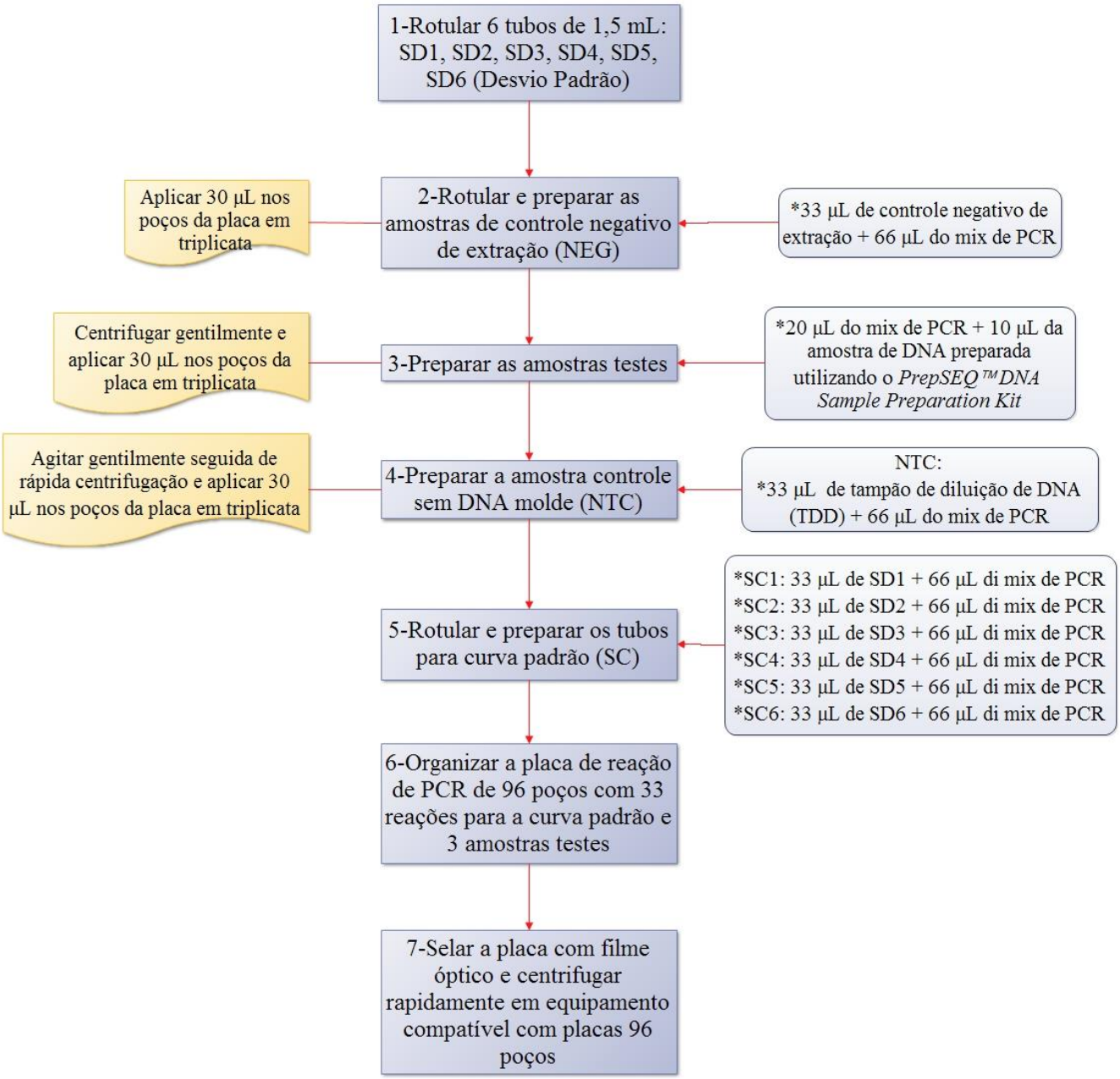


Figura 4.4: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa do preparo da curva padrão.

Fluxograma qPCR - Preparo das diluições seriadas do DNA controle (*resDNASEQ™ Quantitative DNA kit- Applied Biosystems*)

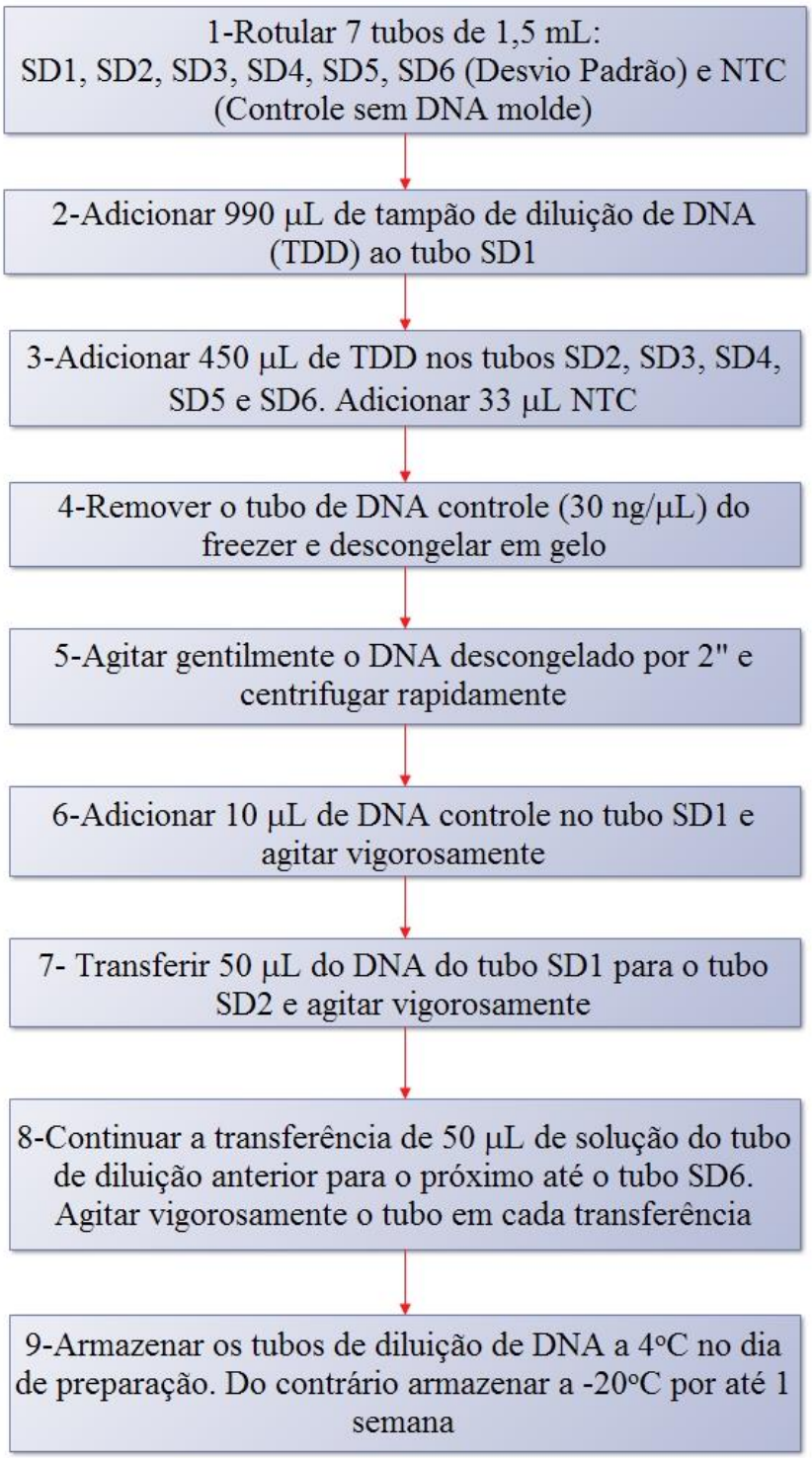
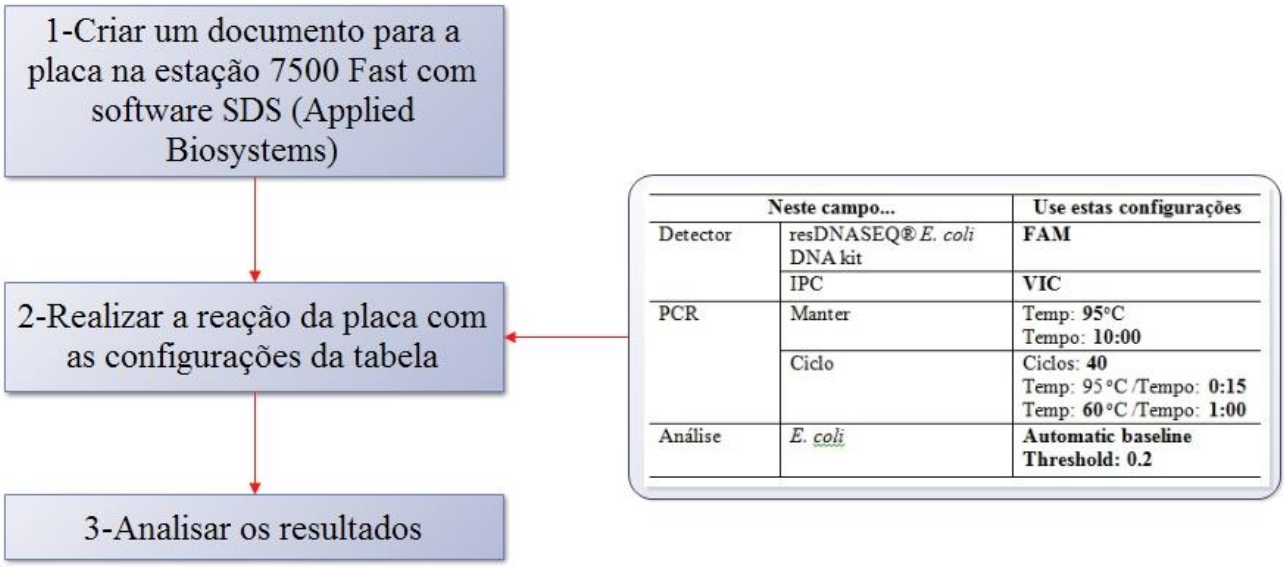


Figura 4.5: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa das diluições seriadas.

Fluxograma qPCR - PCR em tempo real
(*7500 Fast instrument with 7500 Fast instrument SDS software - Applied Biosystems*)



Neste campo...		Use estas configurações
Detector	resDNASEQ® *E. coli* DNA kit	**FAM**
	IPC	**VIC**
PCR	Manter	Temp: **95°C** Tempo: **10:00**
	Ciclo	Ciclos: **40** Temp: 95 °C /Tempo: **0:15** Temp: **60** °C /Tempo: **1:00**
Análise	*E. coli*	**Automatic baseline** **Threshold: 0.2**

Figura 4.6: Fluxograma do ensaio de qPCR, etapa do PCR em tempo real.

Fluxograma *Threshold* - Método de extração de DNA livre de fenol (*Kit DNA Extractor* - *Wako Chemicals USA*)

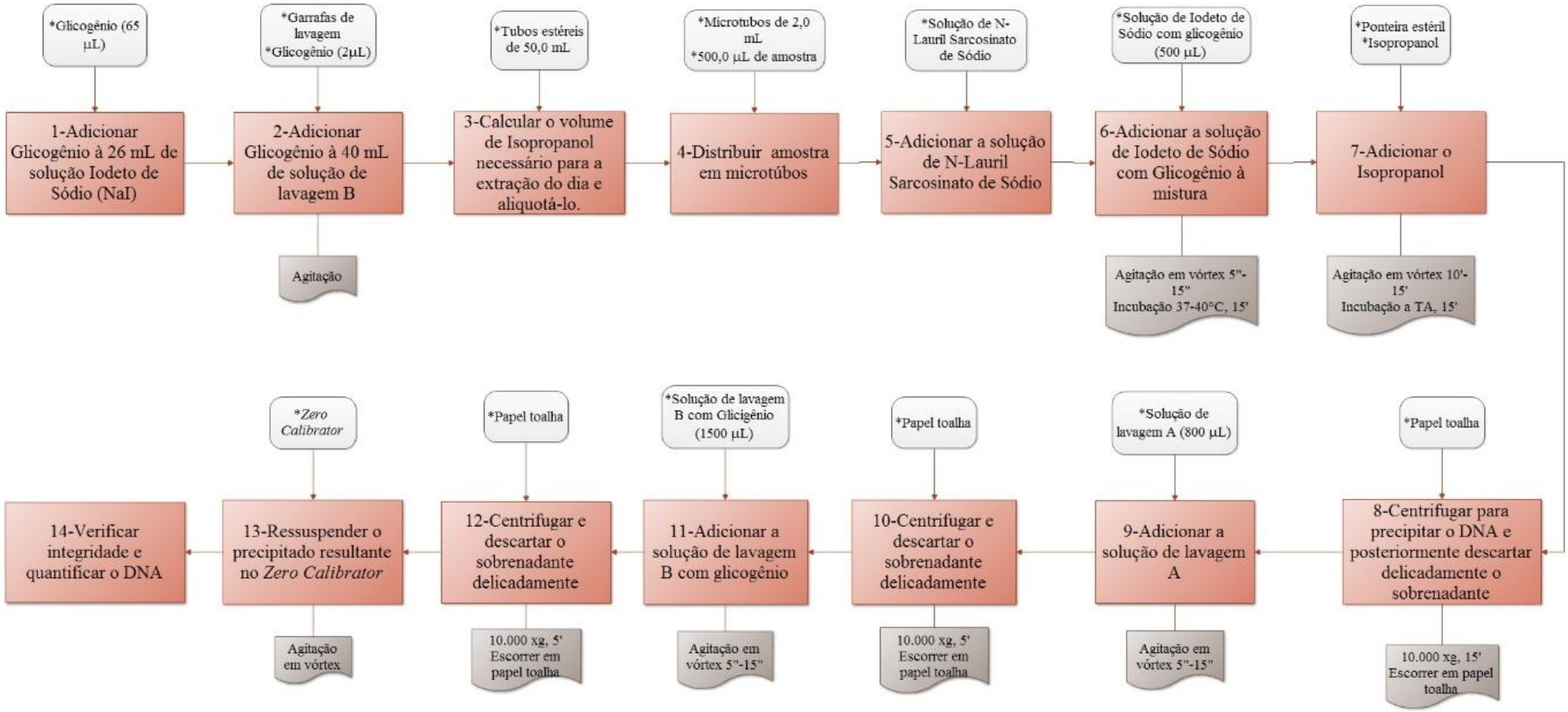


Figura 4.7: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa de extração de DNA.

Fluxograma *Threshold* - Preparação e verificação da integridade de padrões de DNA: Espectrofotometria

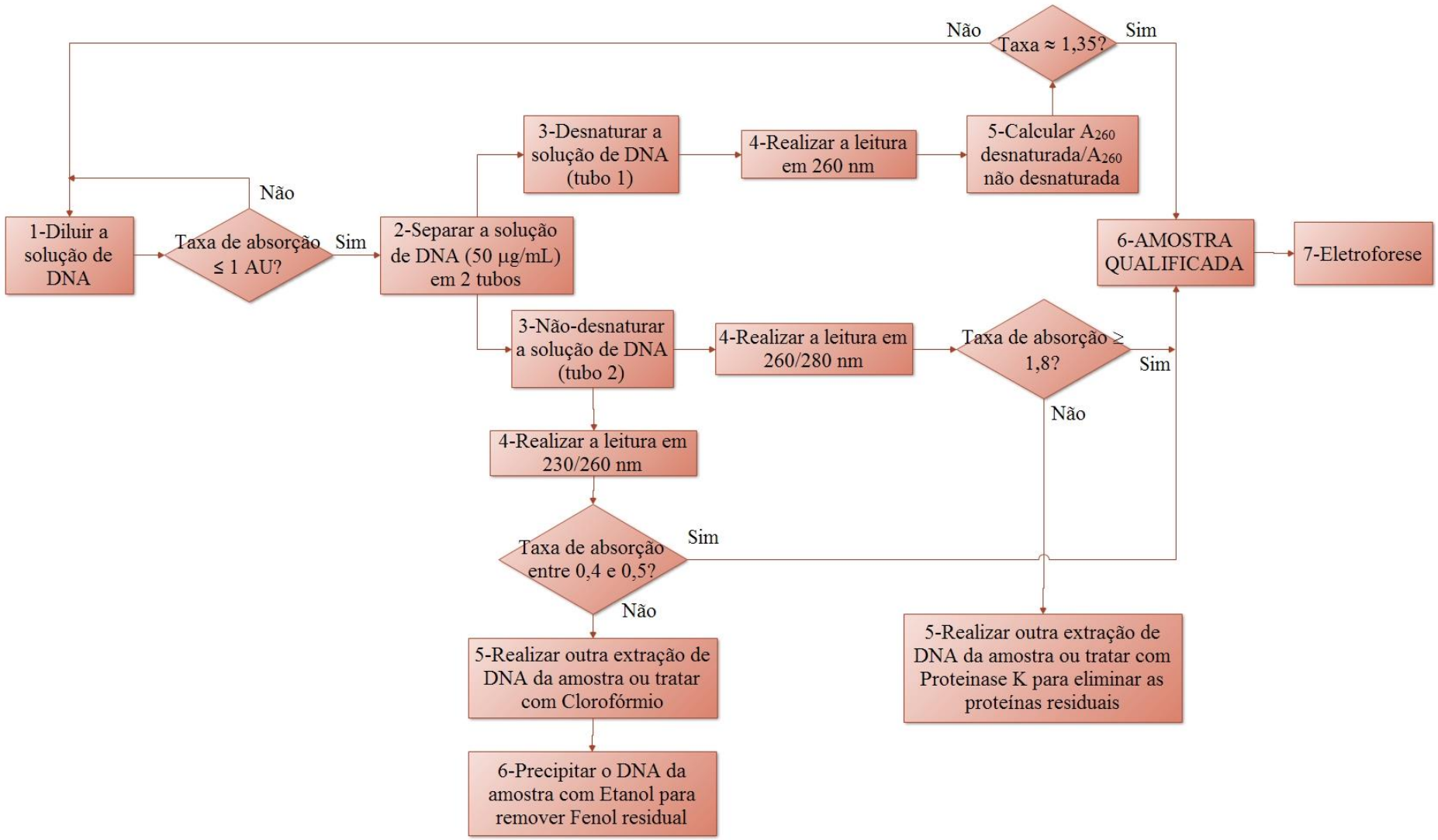


Figura 4.8: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da espectrofotometria. **AU:** unidade de absorção.

Fluxograma *Threshold* - Preparação e verificação da integridade de padrões de DNA: Eletroforese

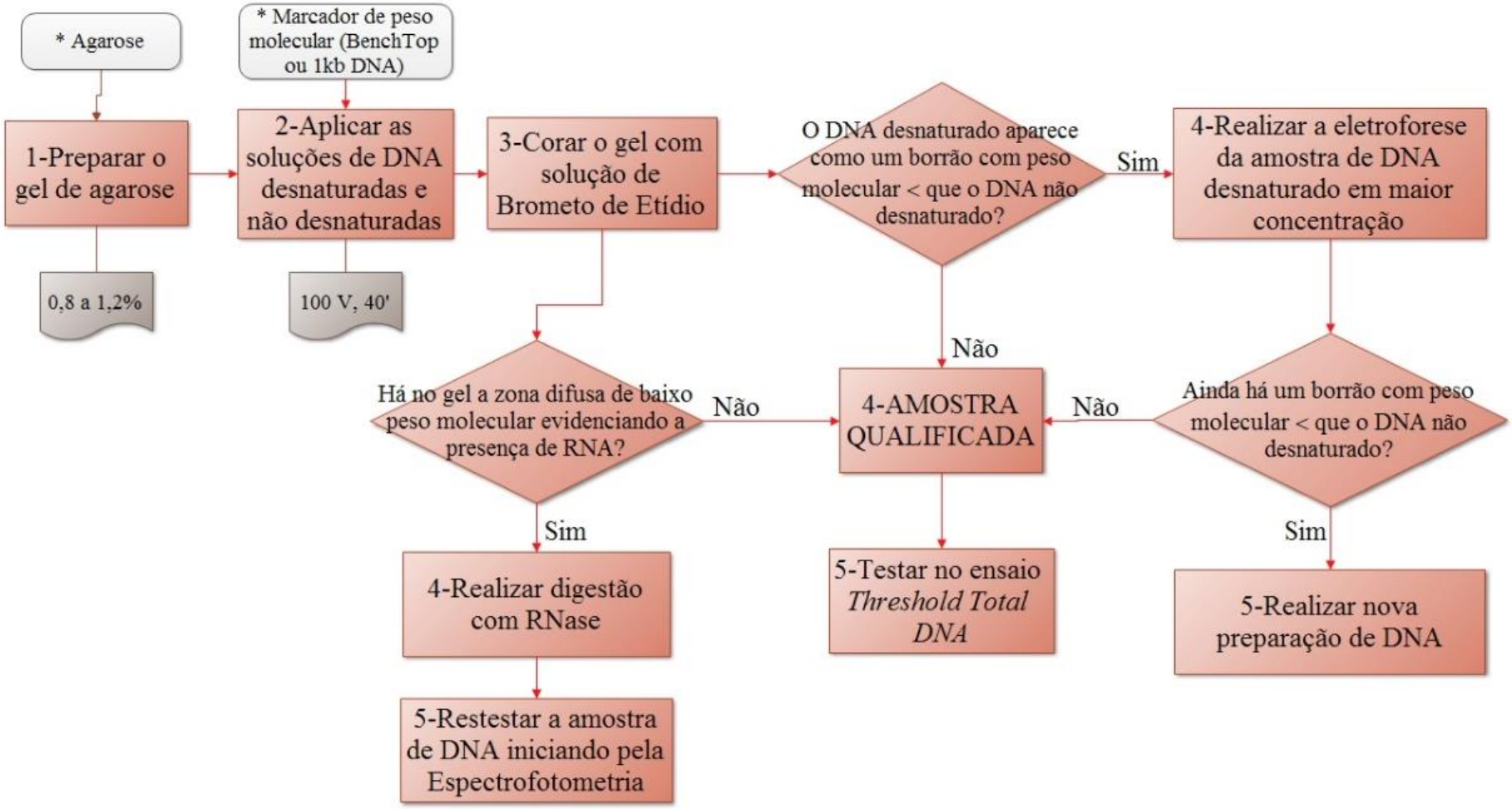


Figura 4.9: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da eletroforese.

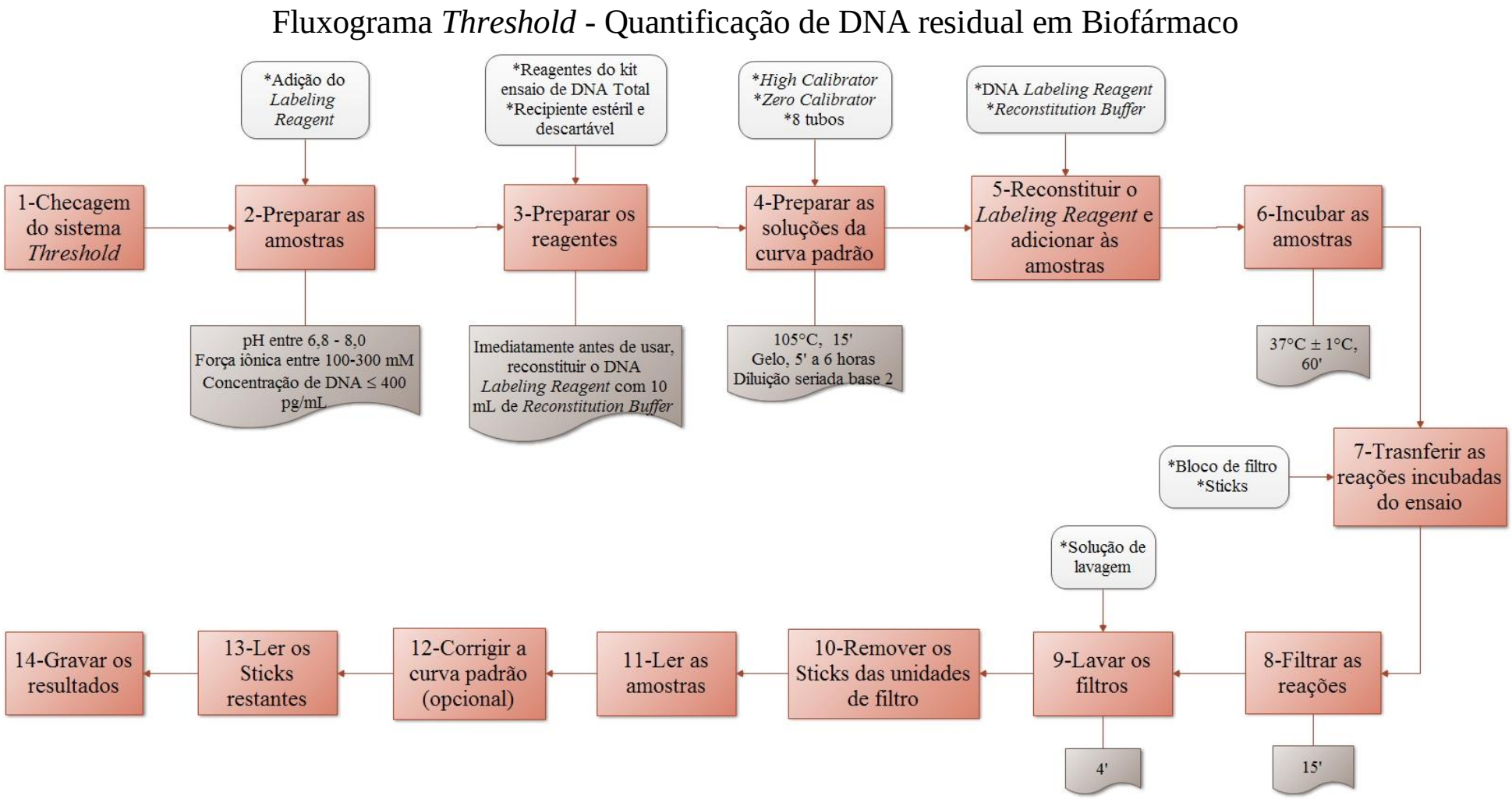


Figura 4.10: Fluxograma do ensaio *Threshold*, etapa da quantificação de DNA.

Pode-se observar entre as metodologias alternativas avaliadas qPCR e o *Threshold*, excluindo-se as fases de tratamentos de amostras que existem dois passos chaves para ambos, até mesmo por se tratarem de ensaios para quantificação de DNA: a extração de DNA e a desnaturação da fita dupla em fita simples. O primeiro passo é por necessidade de se ter material de partida - ácido desoxirribonucleico para seguimento do trabalho e o segundo passo de vital importância que é a desnaturação do DNA, porém, por peculiaridades específicas de cada processo a temperatura da mesma pode variar entre 95 ºC – 105ºC, dependendo da técnica a ser utilizada e de como o procedimento é estabelecido.

O qPCR necessita desnaturar o DNA para que as contínuas reações de amplificação da molécula possam aumentar o número delas para que a quantificação possa ser realizada. Já no caso do *Threshold*, a desnaturação deve ocorrer, obrigatoriamente, por se tratar de um ensaio enzimático que tem a capacidade de quantificar todas as moléculas de DNA fita simples que são capturadas pelo conjugado biotina-estreptavidina-anticorpo anti-fsDNA. Indiscutivelmente, só haverá a quantificação de DNA no IFNα-2b se durante o processo de produção o DNA de célula hospedeira ficar contido na IFA após sua purificação.

4.2 – Diagrama de causa e efeito (Ishikawa ou espinha de peixe)

O uso de uma abordagem de equipe para a resolução de problemas, muitas vezes leva a muitas opiniões para a causa raiz do problema. Uma maneira de capturar essas ideias diferentes e estimular o *brainstorming* da equipe nas causas raiz é o diagrama de causa e efeito, comumente chamado de espinha de peixe ou diagrama de Ishikawa. A espinha de peixe vai ajudar a mostrar visualmente as muitas causas potenciais para um problema específico ou efeito. É particularmente útil em um ambiente de grupo e para situações em que poucos dados quantitativos estão disponíveis para análise (Crocker et al., 1984; Tague, 2004).

Os ensaios em estudo apresentam características comuns por serem utilizados para o mesmo fim, a quantificação de DNA, apesar dos métodos serem diferentes, apresentam riscos semelhantes. A partir destas informações, foi desenhado um diagrama de causa e efeito geral que abrange as fontes de variabilidade ou perigos dos mesmos que podem estar associados a cada etapa do procedimento (Figura 4.11).

Representação esquemática de causa e efeito das possíveis fontes de variabilidade nos ensaios de quantificação de DCH

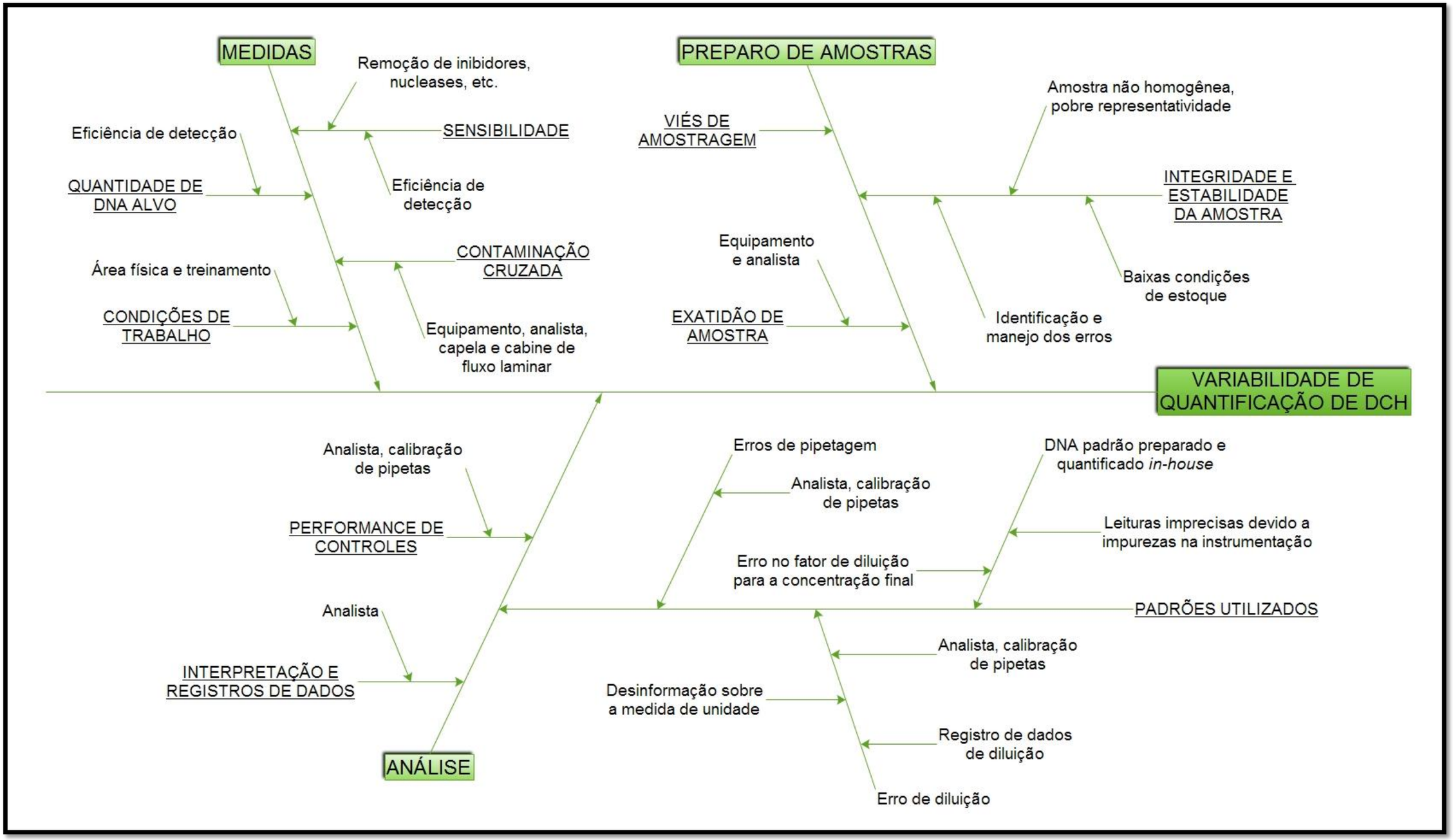


Figura 4.11: Diagrama de causa e efeito das possíveis fontes de variação nos ensaios de quantificação de DNA de célula hospedeira (DCH).

Esse diagrama tem um benefício maior para auxiliar e ajudar a trazer uma exploração mais aprofundada das questões por trás dos problemas – o que vai levar a uma solução mais robusta das proposições sejam elas intrínsecas às questões metodológicas ou mesmo a procedimentos pertinentes na execução dos ensaios que envolvam o elemento humano.

Mehta e Keer (2007) indicam que um processo analítico apresenta três estágios (causas principais) nos quais uma variabilidade de sugestões pode ocorrer: o preparo das amostras, as medidas analíticas e a análise como evidenciados pela figura 4.10. Neste estudo, a pergunta principal concentra-se na variabilidade da quantificação de DNA da célula hospedeira, as causas relacionadas com o primeiro estágio (preparo de amostras) expressam dois níveis de dependência onde normalmente encontramos as causas raiz da abordagem; quanto mais respondemos às causas de cada abordagem, estamos chegando o mais perto possível das causas raiz do problema. Como causas secundárias no preparo das amostras, observa-se o viés de amostragem, a exatidão de amostra e a integridade e estabilidade da amostra. Relaciona-se secundariamente, ao segundo estágio, às medidas da quantidade de DNA alvo, as condições de trabalho, a sensibilidade e a contaminação cruzada. Já para o terceiro estágio - análise, estão relacionadas à performance de controles, a interpretação e registros de dados e os padrões utilizados. A cada estágio seguem as causas terciárias, que refinam os questionamentos e são direcionadas às respostas que vão de encontro às causas raiz. Podemos observar, de maneira geral, que os desvios no preparo de amostras, particularmente, são influenciados pelas condições das mesmas e a interferência do analista ao manipulá-las. No caso das medidas, esses erros estão relacionados, principalmente, às áreas de trabalho, aos equipamentos e ao analista. Já os erros dentro da análise, basicamente, relacionam-se ao analista e à calibragem de pipetas (figura 4.11). Nestes casos, o componente humano pode ser minimizado com treinamentos, consciência e eficiência na realização do ensaio.

Os métodos de quantificação de DCH, como observado, apresentam fontes de variabilidade. Fontes de variabilidade nos processos de análise e metodologia podem dar origem à incerteza de medição. Uma série de fatores pode contribuir para a precisão global de determinação DCH (Eurachem/CITAC, 2012). A figura 4.12 representa esquematicamente algumas das etapas onde a variabilidade pode ocorrer e que se pode verificar, maioritariamente, que estão relacionados às condições do local de trabalho, aos instrumentos e aos analistas.

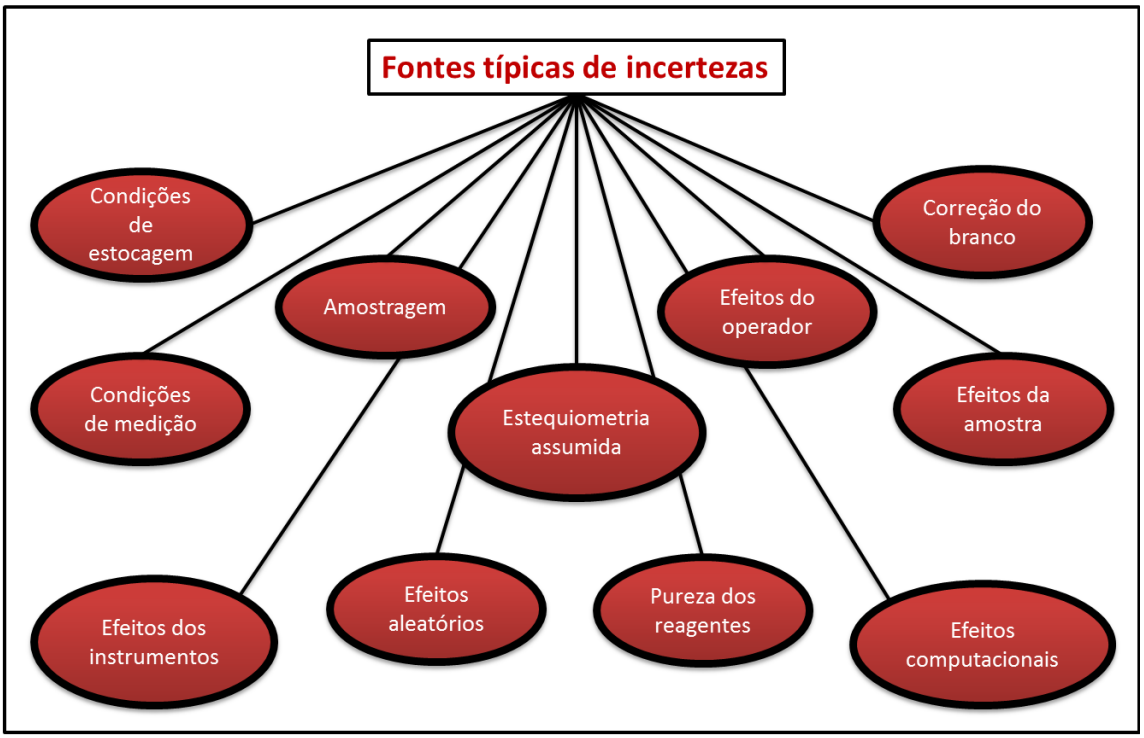


Figura 4.12: Ilustração indicativa das fontes típicas de incertezas (Modificado de Eurochem/CITAC, 2012).

4.3 – Implementação do HACCP

O conceito de HACCP pressupõe um estudo sistemático para identificar os perigos, avaliar a probabilidade dos mesmos acontecerem durante o processo, a distribuição ou o uso do produto e definir meios para controlá-los. Como este estudo é exploratório, ou seja, as metodologias estudadas não são aplicadas com a finalidade de investigar traços de DNA da célula hospedeira no produto final, foi necessário montar as tabelas de perigos, causas e efeitos.

4.3.1 – Tabelas de perigos, causas e efeitos.

A partir da análise dos fluxogramas de cada ensaio e do diagrama de espinha de peixe desenhados, foi feita uma tabela para cada ensaio detalhando os perigos, as causas, os efeitos e relacionando a eles, as possíveis detecções e as medidas de mitigação desses perigos, separados por cada etapa dos ensaios como se pode observar abaixo pelas tabelas 4.1 (dot-blot radioativo); 4.2 (qPCR) e 4.3 (*Threshold*). Essas tabelas foram de grande importância para a análise profunda dos riscos a fim de auxiliar na verificação dos pontos críticos em cada um deles. Foram observados 25 perigos para o dot-blot radioativo nas oito etapas do ensaio, 14 perigos nas cinco etapas do qPCR e 19 perigos nas cinco etapas do *Threshold*. Pelas tabelas abaixo se

verifica, também, que mesmo diferentes, vários desses perigos, nos respectivos ensaios, apresentam causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação semelhantes, o que nos permite dizer, que alguns perigos são comuns aos três ensaios como, por exemplo, contaminação cruzada, volumes fora da especificação e interpretação de dados. O que nos leva a questões que envolvem componente humano e instrumental. O dot-blot radioativo tem uma peculiaridade por ser um método semi-quantitativo, não envolve um equipamento para leitura final do resultado, o que permite uma variabilidade na interpretação do resultado, nos outros casos um equipamento está associado ao resultado quantitativo e intrinsicamente a variabilidade está na qualificação do instrumental. Junto a isso somam-se os problemas com descalibração dos equipamentos, que são problemas de fácil solução ao se estabelecer calibrações periódicas dos mesmos. Outro ponto importante de perigo relacionado tanto com o dot-blot radioativo quanto com o *Threshold* diz respeito ao alcance da temperatura de desnaturação da molécula de DNA ao se fazer uso de um termobloco para ambos. Verificamos que o termobloco é de grande importância para ambos e que torna de grande necessidade a obtenção de um fornecedor qualificado para evitar transtornos de trabalho.

Outro ponto que vale destacar é que, diferentemente do qPCR e do *Threshold*, que possuem kits já qualificados e com garantia do uso específico, o dot-blot radioativo é um ensaio *in house*, ou seja, é necessário que todos seus reagentes sejam preparados em laboratório pelos próprios analistas, qualificando-os para sua utilização no ensaio, além de manter essas características com avaliações frequentes. Isso eleva a variabilidade nos resultados por aumentar as fontes de incertezas do ensaio. Com isso, o dot-blot torna-se mais dispendioso em relação à tempo, trabalho e cuidados que acabam elevando a probabilidade dos riscos e de interferências negativas nos resultados esperados.

De maneira geral foi observado que são de extrema importância a fim de se mitigar os riscos aos ensaios: os treinamentos, as calibrações e as boas práticas laboratoriais (BPL).

A importância de se trabalhar na rotina de produção com equipamentos e reagentes validados e qualificados, passa pela minimização da variabilidade nos resultados.

Tabela 4.1: Perigos, suas causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação para o ensaio de Dot Blot radioativo.

Dot Blot radioativo

ETAPA	PERIGO	CAUSA	EFEITO	DETECÇÃO	MEDIDAS DE MITIGAÇÃO
Desnaturação do DNA no preparo da sonda	Contaminação cruzada	Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e positivo fora do padrão	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
	A temperatura de 95°C não é atingida	Equipamento descalibrado	As moléculas de DNA não são desnaturadas	Termômetro do termobloco	Plano mestre de calibração
	A temperatura de 95°C não é uniforme em todo termobloco	Fissuras no termobloco	Não há uniformidade na desnaturação das amostras e padrões	Termômetro nos poços	Observação, comparação de resultados e análise visual do termobloco
	Preparo de reagentes	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável.	Treinamento
	Material do termobloco fora da especificação	Fornecedor não qualificado	Não há desnaturação ou uniformidade da mesma		Qualificar o fornecedor
Fixação à membrana de nylon	Uso de membranas fora da especificação	Fornecedor não qualificado	Não há a fixação do DNA	Não detectável.	Qualificar o fornecedor
	A fixação não ocorre	Tempo de exposição insuficiente e vida útil da lâmpada de UV		Observação do tempo de vida útil da lâmpada	Cadastro rotineiro do tempo de cada uso da lâmpada UV
	Preparo de reagentes	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável.	Treinamento
Marcação da sonda	Não há de ligação entre os dDTPs e α-dATP^{32}	A sonda não foi digerida	Resultado fora do especificado	Checagem da digestão por eletroforese	Seguir corretamente POP; treinamento específico para lidar com isótopos radioativos; plano mestre de calibração
	Decaimento radioativo	Meia-vida do isótopo radiativo		Checagem com contador de partículas	
	Contaminação do analista	Operador	Afastamento, doença do analista	Exames médicos; não detectável	Uso de EPIs; realizar etapa em área segregada e devidamente protegida para o trabalho com radioisótopos
Purificação	Coluna de purificação fora da especificação (tipo e *beads*)	Operador	A sonda marcada não é purificada	Checagem da purificação por contagem de partículas radiativa no eluato	Seguir corretamente o POP; treinamento
Extração de DNA da célula hospedeira na IFA	Contaminação cruzada	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável; controle positivo	Seguir corretamente o POP; treinamento
		Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e positivo fora do padrão	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
		Rotulagem errada	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; treinamento
	Preparo de reagentes	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável.	Treinamento
	Volume fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Resultado fora do esperado	Não detectável	Plano mestre de calibração
Pré hibridização e Hibridização	Volume fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Volume insuficiente para cobrir a membrana de hibridização	Visualmente	Seguir corretamente o POP; treinamento
	Não ocorrência de hibridização	A temperatura de pré-hibridização e hibridização não é atingida	DNA e sonda não hibridizam	Termômetro do forno de hibridização	Plano mestre de calibração
	Preparo de reagentes	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável.	Treinamento
	Solução de hibridização	Concentração dos componentes	DNA e sonda não hibridizam	Não detectável	Treinamento dos operadores no preparo de soluções
Revelação	Filme de raio-X	Data de validade	Não marcação no filme	Visualmente pelo operador	Qualificar fornecedor, reposição periódica de filmes no quarto escuro
	Quarto escuro e montagem do cassete	Montagem da sequência errada		Operador verificar se o quarto está totalmente escuro. Seguir sequência do POP	Checar periodicamente a manutenção de escuridão do quarto
	Armazenamento do cassete	Diferença na temperatura -70C para ocorrer o *print* no filme de raio X		Verificar que o cassete esteja embrulhado em material escuro e deixar em contato com o gelo seco em caixa isotérmica	Garantir fornecimento de gelo seco e manutenção da caixa isotérmica
	Preparo de reagentes	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável.	Treinamento
	Revelação	Data de validade dos agentes de revelação e fixação	Manchas no filme - resolução ruim	Operador verificar validade dos insumos	Qualificar o fornecedor, trocar periodicamente as soluções
Análise de resultados	Interpretação de dados	Avaliação sem levar em consideração o protocolo padrão	Alteração do resultado esperado	Observação dos parâmetros da curva padrão; comparação com outros experimentos e dados históricos; o resultado é semiquantitativo por comparação	Treinamento

POP: Protocolo Operacional Padrão **UV:** raios ultravioletas; **dDTPs:** Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados; **α-dATP^{32}:** Adenosina trifosfato marcado com fósforo 32; **IFA:** Ingrediente Farmacêutico Ativo; **EPIs:** Equipamentos de Proteção Individual.

Tabela 4.2: Perigos, suas causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação para o ensaio de qPCR.

qPCR

ETAPA	PERIGO	CAUSA	EFEITO	DETECÇÃO	MEDIDAS DE MITIGAÇÃO
Extração de DNA de célula hospedeira na IFA	Contaminação cruzada	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; treinamento
		Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e positivo fora do padrão	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização e limpeza do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
		Rotulagem errada	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; treinamento
	Volume fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Resultado fora do esperado	Não detectável	Plano mestre de calibração
Preparo do Master MIX da reação	Utilização de volumes de *primers* e sondas incorretos	Pipetas automáticas descalibradas	Alteração do resultado esperado	Visualmente	Plano mestre de calibração
	Contaminação cruzada	Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e controle positivo fora do especificado	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização e limpeza do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
	Troca da solução de DNA-estoque com DNA-trabalho	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável	Rotulagem correta; treinamento
Preparo das diluições seriadas do DNA controle e preparo da curva padrão	Volume fora de especificação	Erro no cálculo de diluição	Alteração do resultado esperado	Revisão dos cálculos; resultado fora da especificação	Seguir POP; Treinamento
		Pipetas automáticas descalibradas		Visualmente	Plano mestre de calibração
		Pipetagem imprecisa		Visualmente	Treinamento
	Degradação do DNA	Armazenamento inadequado	Resultado falso negativo	Ausência de sinal de detecção	
	Contaminação cruzada	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente POP; treinamento
		Rotulagem errada			
		Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e controle positivo	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
	Interferência na leitura	Bolhas nos poços	Alteração do resultado esperado	Visualmente, observação do fundo dos poços	Homogeneizar a solução observando o fundo do poço
PCR em tempo real	Troca das posições corretas de amostras e controles na placa	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; uso de espelho da placa como guia; uso de sistema luminoso para aplicação nos poços; treinamento
	Inversão da posição da placa				Seguir corretamente o POP; treinamento
	Degradação de *primers*, *Taq* e sondas	Insumos fora da especificação	Resultado falso negativo	Análise dos controles	Teste com DNA padrão para verificar integridade; qualificar o fornecedor
		Temperatura de armazenamento		Termômetro	Controle rotineiro da temperatura do freezer; plano mestre de calibração
	Interferência da leitura óptica	Arranhão no adesivo da placa	Interferência no resultado esperado	Visualmente	Cuidado ao colar o adesivo na placa
		Placa fora da especificação		Confirmação da especificação da placa	Qualificar o fornecedor
		Falta de limpeza na base do equipamento		Visualmente; checagem pelo operador (POP)	Limpeza rotineira
		Equipamento descalibrado		Análise dos controles negativo e positivo	Calibração rotineira com o fluoróforo
		Talco das luvas			Uso de luvas de nitrila e qualificação de fornecedor
Análise de resultados	Interpretação de dados	Avaliação sem levar em consideração o POP e resultados esperados	Alteração do resultado esperado	Observação do perfil geral de amplificação e parâmetros da curva padrão; comparação com outros experimentos e dados históricos	Análise de cada uma das amostras individualmente, treinamento.

POP - Protocolo Operacional Padrão; **IFA:** Ingrediente Farmacêutico Ativo

Tabela 4.3: Perigos, suas causas, efeitos e detecção para o ensaio de *Threshold.*

Threshold

ETAPA	PERIGO	CAUSA	EFEITO	DETECÇÃO	MEDIDAS DE MITIGAÇÃO
Extração de DNA de célula hospedeira na IFA	Contaminação cruzada	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; treinamento
		Aerossóis	Resultado falso positivo	Resultado dos controles negativo e positivo fora do padrão	Realizar etapa em capela em área segregada; esterilização do local de trabalho; material específico para cada capela; ponteiras com filtro; treinamento
		Rotulagem errada	Alteração do resultado esperado	Não detectável - Somente no resultado final	Seguir corretamente o DE; treinamento
	Volume fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Não ocorrência de extração; resultado falso negativo		Plano mestre de calibração
	Preparo de soluções	Concentração dos componentes	Não ocorre a extração de DNA	Não detectável	Treinamento dos operados no preparo de soluções
Espectrofotometria	Diluição das amostras	Erro no cálculo de diluição	Alteração do resultado esperado	Revisão dos cálculos; conforme POP	Treinamento no POP
		Pipetas automáticas descalibradas		Visualmente	Plano mestre de calibração
		Pipetagem imprecisa			Treinamento
	Leituras incorretas	Leitores espectrofotométricos descalibrados		Não detectável	Plano mestre de calibração
	Preparo de soluções	Concentração dos componentes	Não ocorre a extração de DNA	Não detectável	Treinamento dos operados no preparo de soluções
Eletroforese	Volume fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Alteração do resultado esperado	Visualmente	Plano mestre de calibração
		Pipetagem imprecisa			Treinamento
		Excesso de volume aplicado ao poço	Resultado falso positivo	Resultado dos controles fora do especificado	
	Não ocorrência da migração eletroforética ou perda das amostras no gel	Programação do equipamento fora do especificado (voltagem/tempo)	Ausência de resultado	Visualmente; checagem pelo operador (POP)	Seguir corretamente o POP; treinamento
		Uso de água em vez de tampão (gel; cuba)			
		Inversão de pólos na corrida eletroforética			
Quantificação de DNA na IFA	Volume de *Labeling Reagente* (reagente marcador) fora de especificação	Pipetas automáticas descalibradas	Alteração do resultado esperado	Visualmente	Plano mestre de calibração
		Pipetagem imprecisa			Treinamento
	A temperatura de 105°C não é atingida	Equipamento descalibrado	As moléculas de DNA não são desnaturadas	Termômetro do termobloco	Plano mestre de calibração
	A temperatura de 105°C não é uniforme em todo termobloco	Fissuras no termobloco	Não há uniformidade na desnaturação das amostras e padrões	Termômetro nos poços	Observação, comparação de resultados e análise visual do termobloco, Plano mestre de calibração
	Material do termobloco fora da especificação	Fornecedor não qualificado	Não há desnaturação ou uniformidade nos poços do termobloco	Não detectável.	Qualificar o fornecedor, Plano Mestre de calibração
	Troca das posições corretas de amostras nos *sticks*	Operador	Alteração do resultado esperado	Não detectável - somente no resultado final	Seguir corretamente o POP; treinamento
	Não ocorrência de reação catalítica	Exaustão do substrato, quantidade insuficiente de substrato calculado para a reação			
	Alteração na programação padrão para a reação	Operador			Treinamento
	Contaminação cruzada	Aerossóis	Resultado falso positivo		Realizar etapa em capela ou cabine
		Rotulagem errada	Alteração do resultado esperado		Seguir corretamente o POP; treinamento
	Não são formados os complexos enzimáticos na membrana do *stick*	Descalibração da bomba de vácuo	Resultado falso negativo		Plano mestre de calibração
		Rompimento da membrana			Treinamento, análise dos filtros antes do uso, Qualificar fornecedor
	Incubação incorreta das amostras	Descalibração do banho	Não ocorrência da reação das amostras com o *Labelling Reagent*	Termômetro	Plano mestre de calibração
Análise de resultados	Interpretação de dados	Avaliação sem levar em consideração o protocolo padrão	Alteração do resultado esperado	Observação dos parâmetros da curva padrão; comparação com outros experimentos e dados históricos	Análise de cada uma das amostras individualmente em cada etapa do processo, treinamento

POP - Protocolo Operacional Padrão; IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo

4.3.2 – Pontos críticos de controle (PCC)

Há um novo conceito das agências regulatórias, em que a consistência de produção de biológicos não pode estar somente baseada nos POPs e ações corretivas e preventivas cabíveis. O conhecimento aprofundado do processo e seu controle é direcionado de forma a melhorar a qualidade dos processos e consequentemente dos produtos (Gnoth *et al*. 2007).

Os PCC são pontos em que o controle pode ser aplicado e é essencial para prevenir ou eliminar um perigo para qualidade farmacêutica, ou reduzi-la a um nível aceitável. Um PCC no sistema HACCP pode ser mais facilmente determinado pela utilização de uma árvore de decisão como exemplificado na figura 3.1 o que facilita uma abordagem lógica. A maneira que uma árvore de decisão é usada depende da complexidade da operação, por exemplo, embalagem, produção, reprocessamento, armazenamento, distribuição, em qualquer um destes casos um treinamento prévio no seu emprego é condição fundamental. Se um perigo tiver sido identificado em uma fase em que o controle é necessário para a segurança da mesma, e nenhuma medida de controle existir nessa etapa, o produto ou o processo deve ser modificado neste ponto, ou em uma fase mais adiante, de modo a permitir que uma medida de controle seja assegurada para o processo (WHO, 2007; Brown, 2010; WHO, 2010).

Por meio de análise criteriosa de cada etapa dos ensaios metodológicos propostos, foram determinados pontos que podem ameaçar a qualidade do produto. Assim sendo, os PCC além de serem identificados, foram estabelecidos os limites críticos dos mesmos, baseados em informações previas de outros processos similares. Tais pontos poderão ser validados futuramente quando uma metodologia alternativa for implementada. De qualquer forma, os pontos críticos elencados devem ser monitorados para se garantir que eles fiquem dentro dos limites recomendados, caso contrário ações corretivas serão necessárias e os desvios registrados nos documentos formais de não conformidade (WHO, 2007; Brown, 2010; WHO, 2010).

Neste trabalho, são considerados como Pontos de Controle (PC) os pontos ou etapas que afetam a qualidade do produto ou desempenho do processo, mas que podem ser controlados prioritariamente por programas e procedimentos pré-requisitos (BPF, BPL).

Com base nestes pontos, e a partir do auxílio da árvore de decisão exemplificada na figura 3.1 os PCC de cada ensaio foram identificados como visto nas tabelas 4.4, 4.5 e 4.6.

Tabela 4.4: Determinação dos PCCs no ensaio de Dot Blot radioativo.

Etapa do processo	Perigos significativos	Limite crítico	P1	P2	P3	P4	PCC
Desnaturação do DNA – no preparo da sonda	• Contaminação cruzada	Temperatura 95ºC	Não	-	-	-	PC
	• A temperatura de 95°C não é atingida		Sim	Não	Sim	Não	PCC_1
	• A temperatura de 95°C não é uniforme em todo termobloco		Sim	Não	Sim	Não	PCC_2
	• Preparo de reagentes		Sim	Não	Sim	Não	PCC_3
	• Material do termobloco fora da especificação		Não	-	-	-	PC
Fixação do DNA à membrana de nylon	• Uso de membranas fora da especificação	Exposição à UV por 3’	Sim	Sim	-	-	PC
	• A fixação não ocorre		Não	-	-	-	PC
	• Preparo de reagentes		Sim	Não	Sim	Não	PCC_4
Marcação da sonda	• Não há de ligação entre os dDTPs e α-dATP^{32}	Monitoramento contínuo com Geiger	Sim	Não	Sim	Não	PCC_5
	• Decaimento radioativo		Sim	Não	Sim	Não	PCC_6
	• Contaminação pessoal		Sim	Não	Sim	Não	PCC_7
Purificação	• Coluna de purificação fora da especificação (tipo e *beads*)	Coluna Sephadex G-25	Sim	Não	Sim	Não	PCC_8
Extração de DNA de célula hospedeira na IFA	• Contaminação cruzada	Definido após a validação do ensaio	Não	-	-	-	PC
	• Preparo de reagentes		Sim	Não	Sim	Não	PCC_9
	• Volume fora da especificação		Não	-	-	-	PC
Pré-hibridização e Hibridização	• Volume fora de especificação	Temperatura do forno de hibridização 80ºC	Sim	Sim	Não	-	PC
	• Não ocorrência de hibridização		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{10}
	• Preparo de reagentes		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{11}
	• Solução de hibridização						
Revelação	• Filme de raio-X	Temperatura -70ºC, 2 a 5 dias	Sim	Não	Sim	Não	PCC_{12}
	• Quarto escuro e montagem do cassete		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{13}
	• Armazenamento do cassete		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{14}
	• Preparo de reagentes		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{15}
	• Revelação		Sim	Não	Sim	Não	PCC_{16}
Análise de resultados	• Interpretação de dados	-	Sim	Não	Sim	Sim	PC

Pergunta 1 (P1): Existem medidas preventivas para identificar o perigo?
Pergunta 2 (P2): Esta etapa elimina ou reduz a probabilidade de ocorrência do risco?
Pergunta 3 (P3): O risco identificado pode aumentar a níveis inaceitáveis?
Pergunta 4 (P4): As etapas posteriores podem eliminar o risco ou reduzi-lo a níveis aceitáveis?
IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo; **dDTPs:** Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados; **α-dATP^{32}:** Adenosina trifosfato marcado com fósforo 32

Tabela 4.5: Determinação dos PCCs no ensaio de qPCR.

Etapa do processo	Perigos	Limite crítico	P1	P2	P3	P4	PCC
Extração de DNA de célula hospedeira na IFA	• Contaminação cruzada • Volume fora de especificação	(1ml cultivo – 50 ng DNA). Limite de detecção: 10 fg	Sim Sim	Não Não	Sim Sim	Sim Sim	PC PC
Preparo do Mix Master da reação	• Utilização de volumes de *primers* e sondas incorretos • Contaminação cruzada • Troca da solução de DNA-estoque com DNA-trabalho	Definido após a validação do ensaio	Sim Não Não	Sim - -	- - -	- - -	PCC_1 PC PC
Preparo das diluições seriadas do DNA controle e preparo da curva padrão	• Volume fora de especificação • Degradação do DNA • Contaminação cruzada • Interferência na leitura	Armazenamento do DNA de -20 ºC a -80ºC; outros definidos após a validação do ensaio	Sim Sim Não Sim	Não Não - Não	Sim Sim - Sim	Não Não - Não	PCC_2 PCC_3 PC PCC_4
PCR em tempo real	• Troca das posições corretas de amostras e controles na placa • Inversão da posição da placa • Degradação de *primers*, *Taq* e sondas • Interferência da leitura óptica	Definido após a validação do ensaio	Não Não Sim Sim	- - Não Não	- - Sim Sim	- - Não Não	PC PC PCC_5 PCC_6
Análise de resultados	• Interpretação de dados	Definido após a validação do ensaio	Sim	Não	Sim	Sim	PC

Pergunta 1 (P1): Existem medidas preventivas para identificar o perigo?
Pergunta 2 (P2): Esta etapa elimina ou reduz a probabilidade de ocorrência do risco?
Pergunta 3 (P3): O risco identificado pode aumentar a níveis inaceitáveis?
Pergunta 4 (P4): As etapas posteriores podem eliminar o risco ou reduzi-lo a níveis aceitáveis?
IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo

Tabela 4.6: Determinação dos PCCs no ensaio *Threshold*.

Etapa do processo	Perigos	Limite crítico	P1	P2	P3	P4	PCC
Extração de DNA de célula hospedeira na IFA	• Contaminação cruzada	(1ml cultivo – 50 ng DNA). Limite de detecção: 2 pg	Não	-	-	-	PC
	• Volume fora de especificação		Não	-	-	-	PC
	• Preparo de soluções		Não	-	-	-	PC
Espectrofotometria	• Diluição das amostras	$TA_{230/260}$ entre 0,4 e 0,5; $TA_{260/280} \geq 1,8$ e $TA_{260\ desnat}/_{260\ não\ desnat} \approx 1,35$	Sim	Não	Sim	Não	PCC_1
	• Leituras incorretas		Não	-	-	-	PC
	• Preparo de soluções		Não	-	-	-	PC
Eletroforese	• Volume fora de especificação	Agarose 0,8 a 1,2% tempo e voltagem devem ser validados	Não	-	-	-	PC
	• Não ocorrência da corrida eletroforética ou perda das amostras no gel		Sim	Sim	Não	-	PC
Quantificação de DNA na IFA	• Volume de *Labeling Reagente* (reagente marcador) fora de especificação	pH 6,8–8,0; força iônica 100–300 mM; [DNA]≤400 pg/mL; Volume da amostra=500 mL temperatura de desnaturação do DNA=105ºC; outros definidos após a validação do ensaio	Sim	Não	Sim	Não	PCC_2
	• A temperatura de 105°C não é atingida		Sim	Não	Sim	Não	PCC_3
	• A temperatura de 105°C não é uniforme em todo termobloco		Sim	Não	Sim	Não	PCC4
	• Material do termobloco fora da especificação		Não	-	-	-	PC
	• Troca das posições corretas de amostras nos *sticks*		Não	-	-	-	PC
	• Não ocorrência de reação catalítica		Não	-	-	-	PC
	• Alteração na programação padrão para a reação		Não	-	-	-	PC_1
	• Contaminação cruzada		Não	-	-	-	PC
	• Não são formados os complexos enzimáticos na membrana do *stick*		Não	-	-	-	PC
	• Incubação incorreta das amostras		Sim	Não	Sim	Não	PCC_5
Análise de resultados	• Interpretação de dados	Definido após a validação do ensaio	Sim	Não	Sim	Sim	PC

Pergunta 1 (P1): Existem medidas preventivas para identificar o perigo?
Pergunta 2 (P2): Esta etapa elimina ou reduz a probabilidade de ocorrência do risco?
Pergunta 3 (P3): O risco identificado pode aumentar a níveis inaceitáveis?
Pergunta 4 (P4): As etapas posteriores podem eliminar o risco ou reduzi-lo a níveis aceitáveis?
IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo; **TA:** taxa de absorção; **Desnat:** desnaturado.

4.4 – Ensaios alternativos para quantificação de DCH

As preocupações teóricas sobre DNA contaminante como um risco para a saúde surgiram desde meados da década de 1950. A necessidade de produzir grandes quantidades de vacina viral, fez com que a FDA focasse sobre este tópico.

O cultivo de células que proliferam continuamente parecia ser um substrato ideal para a produção de vacinas, mas compartilha várias características críticas com as células cancerosas. A característica mais alarmante compartilhada foi a formação de tumores após a injeção das células em um animal adequado. Além disso, verificou-se o potencial que as linhagens celulares possuem de serem infectadas com vírus (Briggs e Panfili, 1991). Em contrapartida, isso acabou por ser uma preocupação válida como evidenciada pela contaminação viral real de várias vacinas (Hayflick, 1989 *apud* Briggs e Panfili, 1991). Então, na década de 1950 a preocupação era um risco de segurança em medicamentos biológicos devido a vírus e tumores de formação de agentes.

A solução adotada pela FDA em 1962 foi testar e controlar em nível de substrato celular. As culturas de células primárias podiam ser utilizadas para cultivar o vírus da vacina, com exceção das estirpes de células diplóides e as linhagens celulares contínuas. Contudo, essas restrições foram gradualmente reduzidas. Esse relaxamento não representou uma diminuição da preocupação da FDA acerca de impurezas potencialmente oncogênicas. As causas dos tumores são agora mais bem compreendidas, incluindo o fato de que os oncogenes podem estar presentes no genoma de um indivíduo (Lotfipour e Halladj-Nezhadi, 2012). Por isso, a principal preocupação com a contaminação de DNA é que ela pode conter um oncogene ou fazer com que um oncogene seja ativado ou até mesmo desativar um gene inibidor de tumor. No entanto, aumentou-se a confiança de que os produtos podem ser purificados de uma forma adequada e a impureza, no caso a molécula de DNA, pode agora ser monitorizada diretamente (Briggs e Panfili, 1991).

Vários métodos de purificação de DNA, tais como o tratamento de protease, a extração orgânica, a extração livre de fenol "Wako" (Wako Chemicals, www.wako-chem.co.jp/english) e a precipitação por etanol ou glicogênio devem ser verificados para a sua adequação. Algumas diferenças entre os procedimentos de teste de DNA devem ser levadas em conta na interpretação de dados quantitativos (Wolter e Richter, 2005).

A robustez do ensaio é diferente para cada ensaio, especialmente no que diz respeito às substâncias interferentes (Tabela 4.7). Segundo Mehta e Keer (2007), no geral, ensaios de hibridização são mais robustos do que o *Threshold*, ou seja, sofrem menos influência de substâncias interferentes que possam estar nas amostras a serem testadas.

Mehta e Keer (2007) demonstraram que em termos de alcance dinâmico e o limite de detecção/sensibilidade, o qPCR supera todos os métodos (Figura 4.13).

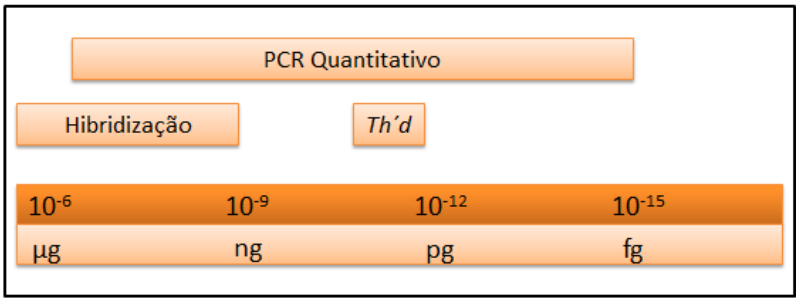


Figura 4.13: Representação esquemática do alcance dinâmico dos métodos de quantificação de DNA. ***Th´d:*** *Threshold;* **µg:** micrograma; **ng:** nanograma; **pg:** picograma; **fg:** femtograma (Adaptado de Mehta e Keer, 2007).

O qPCR tem uma ampla faixa dinâmica e uma sensibilidade muito elevada em comparação com os outros métodos. O *Threshold*, por outro lado, tem um alcance dinâmico menos abrangente, mas é concebido para detectar quantidades baixas do alvo e, assim, é adequado para análise de traço de DCH.

A amostragem do *Threshold* requer uma alíquota de 500 µL, enquanto que o qPCR requer apenas poucos microlitros de amostra para análise. Dessa forma, a análise *Threshold* pode fornecer uma estimativa mais precisa do DNA total presente de uma amostra por minimizar o efeito da variabilidade de amostragem no resultado de quantificação. Contudo a pequena alíquota necessária pela qPCR possibilita menor manipulação da amostra, o que diminui o risco de contaminação e erro do analista.

Em medição analítica, na prática, é mais comum considerar as incertezas associadas com elementos de desempenho do método em geral, tais como precisão e tendências de medida observáveis em relação aos materiais de referência apropriados. Estas contribuições geralmente formam as contribuições dominantes para a estimativa da incerteza, e são mais bem modeladas como efeitos separados sobre o resultado. Em seguida, é necessário avaliar outras possíveis

contribuições apenas para verificar sua significância, quantificando apenas aqueles que são significativos (Eurochem/CITAC, 2012).

Assim sendo, percebe-se a grande importância de uma seleção criteriosa de um ensaio analítico que possa identificar e quantificar as possíveis moléculas de DNA de células hospedeiras em produtos derivados de biotecnologia como o IFNα-2b. Vale lembrar que não há ainda uma exigência oficial por parte da ANVISA delimitando o nível de impureza para esses produtos, apenas uma solicitação que essa quantidade seja o mínimo possível e as indústrias nacionais levem em conta os valores mínimos definidos pelas autoridades internacionais.

Dessa forma, pela importância do produto, IFNα-2b, para Bio-Manguinhos buscaram-se ensaios analíticos farmacopeicos que mantivessem a qualidade do produto de acordo com as normas internacionais. A partir disso, foram escolhidos para esse fim os ensaios de qPCR e *Threshold*.

As ferramentas de análise de risco, são exploradas de forma a melhorar o desempenho dos produtos e processos e com isto auxiliam na performance dos mesmos. Existem várias formas para comparar e avaliar as características de desempenho dos métodos analíticos empregados para a quantificação de DCH como demonstrado pela tabela 5.7, pois tais elementos também são importantes para compor um processo de escolha. O entendimento profundo dos perigos associados às etapas de execução dos métodos analíticos torna a escolha do ensaio mais completa, pois se passa a entender profundamente cada um deles e qual etapa possibilita o menor risco para a avaliação da qualidade do produto. Fato esse que está dentro do conceito do *Design Space* e que, consequentemente, traz maiores benefícios para a empresa em se tratando de aspectos regulatórios, uma vez que, com isso, o ente regulador passa a ser mais flexível, pois percebe que a empresa consegue avaliar os perigos associados a seus processos e prevê medidas para mitigá-los ou mesmo, em alguns casos, para eliminar os perigos potenciais que poderiam ocorrer nos processos/produtos.

Um aspecto importante a ser mencionado é que a Gestão de Risco para a Qualidade, ainda não é uma exigência legal para os ensaios de controle de qualidade, porém a ANVISA já aponta tendências de que o *Design Space* seja uma condição importante a ser definida para cada produto, desde a sua concepção ainda no seu desenvolvimento farmacêutico, o que faz com que Bio-Manguinhos esteja um passo à frente a estas futuras exigências.

Outro ponto a se destacar é que este estudo é inédito dentro da área de controle de qualidade farmacêutica. Não há nenhum trabalho na literatura que faça um estudo comparativo de ensaios analíticos para controle de qualidade por meio de ferramentas de Análise de Risco. Pode-se citar alguns trabalhos que fizeram uso de tais ferramentas para avaliar riscos em instrumentos médicos (Jahnke e Kühn, 2003), para auxiliar na escolha de um bioindicador (Eansoë-Bourget, 2006), para integração de tecnologias de processo de análise, validação concorrente e programas de libertação paramétrica no processamento asséptico (Korczynski, 2004), para analisar a contaminação de áreas limpas (Ljungqvist e Reinmüller, 1995) e para auxílio em monitoramento ambiental (Katayama et al., 2005 e Sandle, 2012), porém, nenhum com objetivos semelhantes a este trabalho.

Tabela 4.7: Características de desempenho dos métodos de quantificação de DCH (Modificado de Wolter e Richter, 2005 e Mehta e Keer 2007).

	Hibridização	***Threshold***	**qPCR**
Custo por teste	~R$1,50	~R$32	~R$3-6
Preço do equipamento	~R$29.400	~R$16.300	~R$65.300 - ~R$392.000
Limite de detecção	10 ng	2 pg (ensaio DNA total)	10 fg (DNA bacteriano) 5 pg (DNA mamífero)
Vazão (incluindo controle das amostras)	*Slot blot*, tipicamente 72 poços	8 poços/paleta, + de 4 paletas em uma corrida	32 capilares, placa de 384 poços
Dificuldade de utilização	Não há kits de reagentes completos disponíveis	Todos os reagentes são fornecidos em kits	Todos os reagentes são fornecidos em kits; *design* e interpretação complexos
Tempo/velocidade	Pelo menos 48 h	Pelo menos 3 h	De 2 a 3,5 h
Método industrial aceito	Menos utilizada	Mais de 300 atualmente em uso na indústria biofarmacêutica	Usado em toda indústria biofarmacêutica
Alcance dinâmico (sensibilidade)	10 ng – 2.500 ng	2 – 200 pg	10 fg – 1 µg, dependendo do genoma
Especificidade do analito	DNA fs e fd	DNA fs ou proteína	DNA fs e fd
Especificidade da sequência	Sequência-específica ou DNA total dependendo da sonda usada; sequência randômica, espécie-específica	Sobretudo DNA total, mas alguns ensaios de sequência-específica são disponíveis; não espécie-específica	Específico para uma sequência alvo
Tam. mín. estimado do DNA (pb) para detecção	50	600	150
Robustez à substâncias interferentes	++	+	+

R$: reais; **ng:** nanogramas; **pg**: pictogramas; **fg:** femtograma; **h**: horas; **min:** minutos; **µg:** microgramas; **fs:** fita simples; **fd:** fita dupla; **pb**: pares de base.

A partir dos PCCs elencados nas duas metodologias avaliadas qPCR, e *Threshold*, juntamente com o dot-blot radioativo (ensaio padrão realizado pelo cessor da transferência de

tecnologia) foi possível montar uma comparação qualitativa do número de PCCs encontrados em cada metodologia como demostrado no quadro 4.1. Várias foram as ferramentas de qualidade (fluxogramas, diagrama de Ishikawa) que deram suporte à ferramenta primordial HACCP neste estudo, entendemos também que por ser um trabalho exploratório, o HACCP foi adaptado para o nosso propósito uma vez que não temos dados analíticos que possam suportar a aplicação da ferramenta na íntegra.

Quadro 4.1: Resumo dos pontos críticos de controle (PCC) para cada ensaio avaliado.

ENSAIO	PCCs	ETAPA
Threshold	**PCC$_2$**: Diluição das amostras	Espectrofotomtetria
	PCC$_2$: Volume de *Labeling Reagente* (reagente marcador) fora de especificação	Quantificação de DNA na IFA
	PCC$_3$: A temperatura de 105°C não é atingida	
	PCC$_4$: A temperatura de 105°C não é uniforme em todo termobloco	
	PCC$_5$: Incubação incorreta das amostras	
qPCR	**PCC$_1$**: Utilização de volumes de *primers* e sondas incorretos	Preparo do Mix Master da reação
	PCC$_2$: Volume fora de especificação	Preparo das diluições seriadas do DNA controle e preparo da curva padrão
	PCC$_3$: Degradação do DNA	
	PCC$_4$: Interferência na leitura	
	PCC$_5$: Degradação de *primers*, *Taq* e sondas	PCR em tempo real
	PCC$_6$: Interferência da leitura óptica	
Dot blot	**PCC$_1$**: A temperatura de 95°C não é atingida	Desnaturação do DNA – no preparo da sonda
	PCC$_2$: A temperatura de 95°C não é uniforme em todo termobloco	
	PCC$_3$: Preparo de reagentes	
	PCC$_4$: Preparo de reagentes	Fixação do DNA à membrana de nylon
	PCC$_5$: Não há de ligação entre os dDTPs e α-dATP^{32}	Marcação da sonda
	PCC$_6$: Decaimento radioativo	
	PCC$_7$: Contaminação pessoal	
	PCC$_8$: Coluna de purificação fora da especificação (tipo e *beads*)	Purificação
	PCC$_9$: Preparo de reagentes	Extração de DNA
	PCC$_{10}$: Não ocorrência de hibridização	Pré-hibridização e Hibridização
	PCC$_{11}$: Preparo de reagentes	
	PCC$_{12}$: Filme de raio-X	Revelação
	PCC$_{13}$: Quarto escuro e montagem do cassete	
	PCC$_{14}$: Preparo de reagentes	
	PCC$_{15}$: Armazenamento do cassete	
	PCC$_{16}$: Revelação	

IFA: Ingrediente Farmacêutico Ativo**; dDTPs:** Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados; **α-dATP^{32}:** Adenosina trifosfato marcado com fósforo 32; **Tam. mín**.: tamanho mínimo

Bonan e colaboradores (2009) destacam que com o método HACCP, os perigos são detectados por um processo de monitoramento e são corrigidos com ações definidas. Esta abordagem destaca os pontos fortes e os pontos fracos do processo.

Analisando o quadro 4.1, que resume os PCC de cada ensaio, verifica-se que o ensaio realizado pelo cessor da transferência de tecnologia, o dot-blot radioativo, é o ensaio que apresenta maior número de PCC, 16 no total. Logo após ele vem o qPCR com 6 PCC seguido do *Threshold* com 5 PCC. Interessante nesta análise comparativa é a diferença dos PCC entre o dot-blot e os outros ensaios alternativos. Talvez esta relação esteja relacionada com a capacidade de detecção ou mesmo pela sensibilidade das metodologias, lembrando que o dot-blot radioativo é um ensaio semi-quantitativo. O qPCR apresenta aproximadamente 63% a menos de PCC que o dot-blot e o *Threshold* em torno de 69% a menos. Algo notável ao se lembrar de que além de menor número de pontos críticos de controle, ambos os ensaios alternativos estudados fornecem resultados quantitativos, diferentemente do dot-blot. Assim, verifica-se que além de mais sensíveis o qPCR e o *Threshold* demonstram também serem mais seguros para a verificação da qualidade do IFNα-2b.

Mehta e Keer em seu trabalho de 2007 comentam que as características de desempenho são extremamente importantes na influência para decisão de um laboratório estabelecer e implementar um método em particular e que um grande número de fatores influenciam a escolha da metodologia analítica incluindo custo, rendimento, confiança regulatória e sensibilidade. Os autores classificaram nove fatores, pesquisados por vários laboratórios, em ordem de importância (Figura 4.14).

Pode-se verificar pela figura 4.14 que a confiabilidade é considerada o fator mais importante da escolha da metodologia analítica, seguido da conformidade regulatória e da sensibilidade.

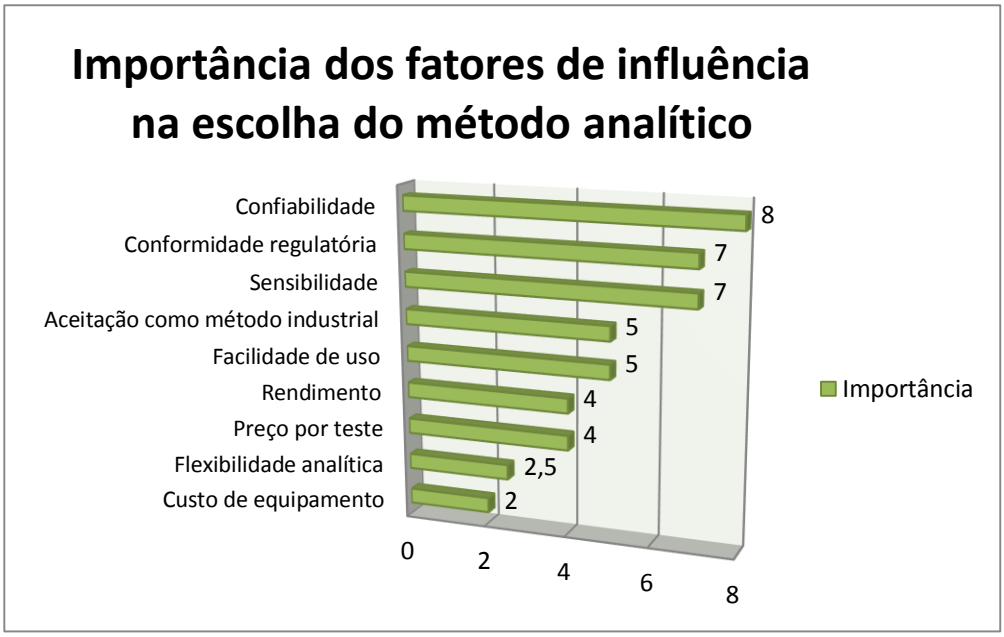


Figura 4.14: Gráfico representativo da importância dos fatores que influenciam na escolha de uma metodologia analítica para quantificação de DCH (Mehta e Keer, 2007).

Pela pesquisa acima, ao se confrontar o qPCR com o *Threshold* pode-se dizer que tanto um quanto o outro possuem sensibilidade para detectar o limite de 100 pg/dose terapêutica de DNA aceitável pela FDA. Ambos são previstos pela farmacopeia americana (2009) como ensaios propícios para quantificação de DNA, logo a conformidade regulatória é a mesma. Resta, então, o fator mais importante que é a confiabilidade. Pelos resultados deste trabalho foi visto que o qPCR apresentou seis PCC, enquanto que o *Threshold* apresentou cinco. A maioria dos PCC do *Threshold* estão presentes apenas em uma fase (quatro), a quantificação na estação de trabalho (equipamento), enquanto que os PCC do qPCR estão distribuídos em três etapas, possuindo ambos ensaios cinco etapas (quadro 4.1, tabelas 4.5 e 4.6). O fato de que a maioria dos PCCs no *Threshold* concentrarem-se em uma única etapa pode representar uma criticidade tal que as medidas de mitigação podem não minimizar os perigos e riscos associados ao equipamento, tais medidas de mitigação refletem a qualificação do projeto, desempenho e instalação, o que em nosso entendimento compete ao fabricante do equipamento, porém a qualificação de operação precisa ser demonstrada no local de operação. Com isso, pode-se dizer também que nesta etapa é fundamental garantir a desnaturação do DNA e a robustez do equipamento precisa responder ao quesito. Um dado não demostrado neste trabalho é que o equipamento *Threshold* adquirido por Bio-Manguinhos possui problemas técnicos específicos no termobloco que não estão garantindo sua qualificação de operação.

Além disso, vale analisar alguns pontos a se considerar para a comparação entre esses ensaios:

1. Ambos apresentam kits comerciais disponíveis;
2. Ambos apresentam assistência técnica;
3. Apesar do *Threshold* apresentar um PCC a menos que o qPCR, a maioria deles está em uma mesma etapa.

Em relação ao primeiro ponto, ambos se equivalem, pois como há kits comerciais disponíveis no mercado, o fornecimento de matérias-primas para a operação dos mesmos não é problema uma vez que existem fornecedores qualificados para este fim. Semelhante ao primeiro ponto, no segundo, os dois ensaios também se equivalem, pois as próprias empresas fabricantes dos equipamentos disponibilizam o serviço. Contudo, a qualificação e a validação do equipamento são fundamentais neste caso (dado não demonstrado), isto está sendo, por enquanto, um problema para o uso do *Threshold*. Já o terceiro ponto é o ponto principal. Essa situação avaliada para o *Threshold* demonstra que esta única etapa, na qual se encontram todos os PCC, é extremamente crítica no processo e dependente da performance do equipamento que, como dito anteriormente, não vem apresentando resultado satisfatório. Por outro lado, o qPCR apresenta maior sensibilidade aliada ao domínio maior da técnica. Mais um fato visto que serve de comparação é que, mesmo o *Threshold* apresentando menos PCC que o qPCR, o ensaio apresenta mais perigos no total, 19 contra 14 (tabelas 4.2 e 4.3).

Então, levando-se em conta a análise realizada entre ambos ensaios alternativos ao dot-blot radioativo, aliados ao volume de amostra, características de desempenho dos métodos (custo por teste, limite de detecção, vazão de amostras e sensibilidade) principalmente considerando-se os perigos identificados, o qPCR apresenta maior confiabilidade, segurança e reprodutibilidade que o *Threshold* no que diz respeito à quantificação de DNA em alfainterferona 2b.

5 – CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o interesse da aplicação das ideias da Gestão de Risco para a Qualidade na escolha de um ensaio para quantificar o DNA de célula hospedeira no produto intermediário Alfainterferon 2b. Esse modelo pode também ser aplicado em outros laboratórios de Bio-Manguinhos fora do Departamento de Controle de qualidade.

O uso da ferramenta HACCP demonstrou ser eficiente para se estabelecer os pontos críticos de controles que serviram de base para comparação entre os ensaios analíticos estudados. O HACCP é um método preciso que destaca questões e explica um processo complexo em detalhe. Este método é útil para focar as etapas de produção e processo, o que pode ter uma influência crítica sobre a qualidade do produto. Com o método HACCP, podem-se concentrar os recursos limitados sobre os pontos críticos identificados. Por fim, a análise de risco também fornece uma revisão dos dados documentados, tais como procedimentos operacionais padrão, de produção e de protocolos *check-up*.

Foram levadas em consideração as normativas nacionais e internacionais que fizeram com que os ensaios escolhidos para avaliação de um método alternativo para o dot-blot radioativo na quantificação de DNA de célula hospedeira fossem o qPCR e o *Threshold* e a partir da análise dos perigos em seus processos pelo uso do HACCP conclui-se que a metodologia analítica alternativa melhor avaliada para a questão proposta é o qPCR, principalmente pela facilidade de manipulação e performance do equipamento. Neste tipo de análise, o local de instalação dos equipamentos e a qualificação dos mesmos passam por análises que podem ser um diferencial que somados aos pontos críticos elencados definem uma metodologia, um investimento não só em equipamento permanente como em treinamento de recursos humanos.

Esse tipo de análise prévia, em se tratando de metodologias analíticas, na qual há uma compreensão detalhada de determinado ensaio, é de grande auxílio para avaliar, aprimorar, controlar e escolher o mesmo, além de possibilitar e facilitar uma melhor busca de causas raiz no que se diz respeito aos possíveis perigos e danos.

O modelo proposto nesse estudo se insere na otimização dos processos produtivos através do controle da qualidade de produtos intermediários, redução de custos e a implantação de processos de melhoria contínua para certificação da qualidade, segurança e eficácia dos imunobiológicos produzidos em Bio-Manguinhos através da inovação, implantação e manutenção das diretrizes nacionais e internacionais que prevê a Análise de Risco como ferramenta de melhora contínua no ciclo de vida dos produtos.

5.1 – Perspectivas e trabalhos futuros

- Validar o qPCR para quantificação de traços de DNA para o biofármaco alfainterferona 2b, tornando-se o padrão ouro.
- Qualificar o equipamento *Threshold*, para que possa ser empregado em outras quantificações de amostras principalmente as de processo.
- Introduzir os conceitos e ideias do uso de ferramentas de Análise de Risco para validação de metodologias analíticas e com isto dar uma maior abrangência ao Programa de Gestão de Risco para Qualidade de Bio-Manguinhos.
- Difundir este trabalho em outros laboratórios de Bio-Manguinhos para sensibilizar que ferramentas de análise de risco podem auxiliar a qualificação de equipamentos e com isto, mostrar o potencial do HACCP com uma ferramenta factível e que pode ser melhor explorada para este fim.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. C**omissão de estudos especiais, cee-63/projeto 63:000.01-002: Gestão de riscos – Técnicas para o processo de avaliação de riscos.** Rio de Janeiro: ABNT, 2011. 103p.

American Society for Quality. **The History of Quality – Overview** [online]. ASQ, Milwaukee, USA; 2011. [capturado 28 jun. 2011] Disponível em: http://asq.org/learn-about-quality/history-of-quality/overview/overview.html.

Anurag S. Rathore P, Branning R, Cecchini D. **Quality: Design Space for Biotech Products.** [online]. BioPharm International. Apr. 1, 2007 [capturado 01 fev. 2012]; Disponível em: http://www.biopharminternational.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=415832

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE 899**. Brasília:2003;1-12.

Arango, JI. **Regulación, políticas y medicamentos esenciales.** In: Lobo, F.; Velásquez, G. (Org.). Los medicamentos ante las nuevas realidades economicas, Madrid: Editorial Civitas, 1997. p. 177-203.(Espanhol)

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. **Basic principles of real-time quantitative PCR.** Expert review of molecular diagnostics. 2005;5(2):209-19.

Bansal AK. **Overview of modern parenteral products and processes.** In: Williams KL, editor. Microbial contamination control in parenteral manufacturing. 2004;140:56- 84.

Barros JAC. **Políticas farmacêuticas: a serviço dos interesses da saúde?** [online]. Brasília, 2004. [capturado 12 mar. 2012]; Disponível em: http://www.healthyskepticism.org/global/books/Politicas_Farmaceuticas

Bio-Manguinhos [online]. **Interferon alfa 2b humano recombinante.** Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil; 2006. [capturado 28 jun. 2011] Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/folder/publicitario_interferon.pdf.

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz** , Rio de Janeiro, Brasil; 2010. [capturado 28 jun. 2011] Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/.

Bionotícias. **Revista de circulação interna.** Disponível no departamento de Relações com o Mercado de Bio-Manginhos edição 20, 2004.

Bonan B, Martelli N, Berhoune M, Maestroni M-L, Havard L, Prognon P. **The application of hazard analysis and critical control points and risk management in the preparation of anti-cancer drugs**. Int J Qual Health Care. 2 de janeiro de 2009;21(1):44–50.

Brandão ACC. **Ensaios para laboratório de controle da qualidade e controle da produção de medicamentos** [online]. INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2001. [capturado em 09 fev. 2012] Disponível em: http://www.boaspraticasfarmaceuticas.com.br/includes/ensaios_lab_medicamentos.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria no 34, de 28 de setembro de 2007. **Dispõe sobre protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C**. Diário Oficial da União nº 194, 8 out 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. **RDC nº 17. Publica regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos.** Diário Oficial da União, 16 de Abril de 2010.

Briggs J, Panfili PR. **Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals**. Anal. Chem. 1 de maio de 1991;63(9):850–9.

Brown A. **Understanding food: principles and preparation**. Cengage Learning; 2010.

Chen C. **Implementing quality by design: ONDQA initiatives** [online]. Advisory Committee for Pharmaceutical Science Oct. 5, 2006. [Capturado 01 fev. 2012]. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/2006-4241s1-index.htm

Chiavenato, I. **Gestão de pessoas o novo papel dos recursos humanos nas organizações.** Rio de Janeiro, Campus, 1999.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. **CNEN-NE-5.01. Transporte de materiais radioativos.** Diário Oficial da União, Agosto de 1988.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. **CNEN-NN-6.01. Requisitos para o registro de pessoas físicas para o preparo, uso e manuseio de fontes radioativas.** Diário Oficial da União, Julho de 1998.

Cohen PL, Manion L, Morrison K. **Research methods in education.** 5th ed. Routledge Falmer; 2000. 464 p.

Cooper MS, ed. **Quality control in the pharmaceutical industry.** New York: Academic Press, 1979. 245 p.

Coppin, C., Porzsolt, F., Awa, A., Kumpf, J., Coldman, A. and Wilt, T. **Immunotherapy for advanced renal cell cancer.** Cochrane Database Syst Rev. 2005, 25:CD001425.

Crocker OL, Chiu JSL, Charney C. **Quality circles: guide to participation and productivity.** Taylor & Francis; 1984.

Denhardt DT. **A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 1966;23(5):641.

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. **Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998 dez 22;95(26):15623–8.

Eansoë-Bourget E. **Risk assessment paradigm: an opportunity for rationalizing the choice of biological indicator during the validation of isolator biodecontamination cycles.** PDA J Pharm Sci Technol. 5 de janeiro de 2006;60(3):156–63.

EMA - European Medicines Agency. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **CPMP position statement on dna and host cell proteins (hcp): impurities, routine testing versus validation studies.** June, 1997. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003322.pdf

Erickson AK, Seiwert S, Gale M. **Antiviral potency analysis and functional comparison of consensus interferon, interferon-alpha2a and pegylated interferon-alpha2b against hepatitis C virus infection.** Antivir Ther. 2008;13(7):851–62.

Eurachem/CITAC. **Guide CG4: quantifying uncertainty in analytical measurement** [onlide]. Eurochem/Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry, United Kingdom; 2012. [capturado 06 jun. 2012] Disponível em: http://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Codex Alimentarius** [online]. 1997. [capturado 13 de fevereiro de 2012]. Disponível em: http://www.haccphelp.com/Documents/Codex.pdf

FDA - US Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. **Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use.** 28 February 1997. Disponível em: http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/OtherRecommendationsforManufacturers/UCM153182.pdf

FDA – US Food and Drug Administration. Silver Spring, USA; 2011. [capturado 05 jan. 2012] Disponível em: http://www.fda.gov/food/foodsafety/hazardanalysiscriticalcontrolpointshaccp/default.htm

Feld JJ, Hoofnagle JH. **Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C.** Nature. 2005 ago 18;436(7053):967–72.

Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo Y-M, Johnson CL, Wang C, et al. **Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005 fev 22;102(8):2986–91.

Gale M, Foy EM. **Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus.** Nature. 2005 ago 18;436(7053):939–45.

Garcia T, Cook G, Nosal R. **PQLI Key Topics - Criticality, Design Space, and Control Strategy.** Journal of Pharmaceutical Innovation. 2008 maio 17;3(2):60–8.

Gil, AC. **Métodos e técnicas de pesquisa social.** 4 ed. São Paulo: Atlas, 1995. 200p.

Gillespie D, Spiegelman S. **A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane.** Journal of molecular biology. 1965;12(3):829–42.

Gnoth, S, Jenzsch, M, Simutis, R, Lübbert, A. **Process analytical technology (PAT): Batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control.** J Biotech 2007; 132: 180-186.

González-Moreno MJ, Guijarro IU, Eiras MLM, Luzar MA. **Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco 1990-1995.** Gobierno Vasco. Departamento de Sanidad; 1997. (Espanhol)

Griffith E. **Risk management programs for the pharmaceutical industry.** [online]. Fujitsu Consulting, Edison/NJ, USA; 2004. [Capturado 06 fev. 2012]; Disponível em: http://www.fujitsu.com/downloads/SVC/fc/wp/pharma-risk-mgmt.pdf

Guo JT, Bichko VV, Seeger C. **Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon.** J. Virol. 2001 set;75(18):8516–23.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, *et al.* **Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose.** Ann. Intern. Med. 2004 mar 2;140(5):346–55.

Hayflick L. **History of cell substrates used for human biologicals**. Dev. Biol. Stand. 1989;70:11–26.

Heim MH. **The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus.** J. Recept. Signal Transduct. Res. 1999 jul;19(1-4):75–120.

Hokama, DA. **Avaliação das melhorias no sistema de controle de qualidade de vacinas em Bio-Manguinhos.** Período 1999-2004. [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos/FIOCRUZ; 2005. 103p.

Huber L. **Validation and qualification in analytical laboratories.** Informa Healthcare; 2007. 316p.

IMA – Institute of Management Accountants. **Enterprise Risk Management: Tools And Techniques For Effective Implementation.** [online]. IMA, Montvale/NJ, USA; 2007. [capturado 06 fev 2012]; Disponível em: http://mgt.ncsu.edu/erm/documents/IMAToolsTechniquesMay07.pdf

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Q9 Quality risk management.** Geneva, Switzerland, Nov, 2005.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Pharmaceutical development Q8(R2).** Geneva, Switzerland, Aug, 2009.

International Conference on Harmonization, Q2A Guideline. **Validation of analytical procedures: definitions and terminology.** Geneva, Switzerland, Oct. 27, 1994.

International Conference on Harmonization, Q2B Guideline. **Validation of analytical procedures: methodology.** Geneva, Switzerland, Nov. 06, 1996.

International Conference on Harmonization, Q5C Guideline. **Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products.** Geneva, Switzerland, Nov. 30, 1995.

International Conference on Harmonization. **The value benefits if ICH to drug regulatory authorities – advancing harmonization for better health** [online]. ICH, Geneva, Switzerland, 2010. [capturado 12 mar. 2012]; Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/News_room/C_Publications/ICH_20_anniversary_Value_Benefits_of_ICH_for_Regulators.pdf

Isaacs A, Lindenmann J. **Virus interference. I. The interferon**. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences. 1957;147(927):258–67.

ISO – International Organization for Standardization**. ISO/IEC Guide 51, Safety aspects - Guidelines for their inclusion in standards.** Second edition: 1999. Switerland.

Jahnke M, Kühn K-D. **Use of the hazard analysis and critical control points (HACCP) risk assessment on a medical device for parenteral application.** PDA J Pharm Sci Technol. 1 de janeiro de 2003;57(1):32–42.

Jia YF, Gao CY, He J, Feng D-F, Xing KL, Wu M, *et al*. **Unlabeled multi tumor marker detection system based on bioinitiated light addressable potentiometric sensor.** Analyst. 2012 ago 21;137(16):3806-13.

Kaplan S, Garrick BJ. **On the quantitative definition of ris**k. Risk analysis. 1981;1(1):11–27.

Katayama H, Higo T, Tokunaga Y, Hiyama Y, Morikawa K. **Establishment of critical contamination risk locations ("hot spots") in environmental monitoring by means of three-dimensional airflow analysis and particulate evaluation.** PDA J Pharm Sci Technol. 1 de janeiro de 2005;59(1):49–63.

Kilpatrick, J. **Educational research: Scientific or political?** Australian Educational Researcher. 1988; 15(2): 13-28.

Korczynski MS. **The integration of process analytical technologies, concurrent validation, and parametric release programs in aseptic processing.** PDA J Pharm Sci Technol. 7 de janeiro de 2004;58(4):181–91.

Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez B Jr, *et al*. **Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system.** Anal. Biochem. 1990 jun;187(2):220-7.

LabCompliance. **Risk management in the (bio)pharmaceutical and device industr**y. [online]. LabCompliance, Oberkirch, Germany; 2010. [capturado 31 jan. 2012]; Disponível em: http://www.labcompliance.com/tutorial/risk/default.aspx?sm=d_a

Lepore J, Spavins J. **PQLI design spac**e. Journal of Pharmaceutical Innovation. 2008 maio 18;3(2):79–87.

Ljungqvist B, Reinmüller B. **Hazard analyses of airborne contamination in clean rooms—application of a method for limitation of risks.** PDA J Pharm Sci Technol. 9 de janeiro de 1995;49(5):239–43.

Longo RMJ. **Gestão da qualidade: evolução, conceitos e aplicação na educaçã**o. IPEA (RI IPEA/TD, n.397/96). Brasília, 1996, 16p.

Lotfipour F, Hallaj-Nezhadi S. **Microbial Quality Concerns for Biopharmaceuticals**. In: Akyar I, organizador. Latest Research into Quality Control [online]. InTech; 2012 [capturado 6 de fevereiro de 2013]. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/microbial-quality-concerns-for-biopharmaceuticals

Lovatt A. **Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products.** J. Biotechnol. 2002 jan;82(3):279-300.

Mangia A, Minerva N, Bacca D, Cozzolongo R, Ricci GL, Carretta V, *et al*. **Individualized treatment duration for hepatitis C genotype 1 patients: A randomized controlled trial**. Hepatology. 2008 jan;47(1):43–50.

Marchetti F. **Metodi analitici** [online]. Istituto Tecnico Industriale Stratale 05 fev. 2012. [Capturado 09 fev. 2012]. Disponível em: http://www.emattei-urbino.it/chimica. (Italiano)

Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, *et al*. **Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis.** Hepatology. 2006 dez;44(6):1543–54.

McDermott RE, Mikulak RJ, Beauregard MR. **The basics of FMEA, 2nd edition**. CRC Press; 2008.

McHutchison JG. **Understanding hepatitis C.** Am J Manag Care. 2004 mar;10(2 Suppl):S21–9.

McNab WB, Alves DM, Lammerding AM. **A general framework for food safety risk assessment (Document No. 2).** 1998. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Guelph, Ontario.

Mehta S, Keer JT. **Performance characteristics of host-cell DNA quantification methods.** BioProcess Technical. 2007 out; 44-58.

Ministério da Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas, vol. I e II** [online]. Brasília, Brasil; 2010. [capturado 12 mar. 2012] Disponível em:

http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/texto/689/187/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas.html

Ministério da Saúde. Inibidores de Protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da Hepatite Crônica C [online]. Brasília, Brasil; julho, 2012. [capturado 07 mar. 2013] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Rel_IP_Hepatite_C_final.pdf

Molecular Devices. Threshold Contaminant Detection System. [online]. Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA; 2011. [capturado 28 jun. 2011] Disponível em: http://www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Threshold-System/Threshold.html.

Montero D. **La armonización en farmacovigilancia: procedimiento ICH.** In: GRUPO IFAS. (Ed.). Nuevas perspectivas de la farmacovigilancia en España y en la Unión Europea. Madrid: Jarpyo Editores, 1998. p.165-173. (Espanhol)

Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. **Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma.** Journal of Clinical Oncology. 2002 jan 1;20(1):289–96.

Nagao Y, Sata M. **Dental problems delaying the initiation of interferon therapy for HCV-infected patients.** Virol J. 2010 ago 17;7:192.

Nygaard AP, Hall B, others. **A method for the detection of RNA-DNA complexes.** Biochemical and biophysical research communications. 1963;12:98.

Olson JD, Panfili PR, Armenta R, Femmel MB, Merrick H, Gumperz J, *et al*. **A silicon sensor-based filtration immunoassay using biotin-mediated capture.** J. Immunol. Methods. 1990 nov 6;134(1):71-9.

Peixoto MM, Santos Jr AF, Santos CAA, Caetité Jr E. **Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em Feira de Santana-BA.** Revista Pharmacia Brasileira, 2005 mar-maio; 9(47): 69-73.

Pestka S. **The Interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn.** J Biol Chem 2007; 282 (28): 20047-20051.

Peterson JJ. **A Bayesian approach to the ICH Q8 definition of design space.** Journal of Biopharmaceutical Statistics. 2008;18(5):959–75.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 804p.

Prasad VJV. **Scope of risk management for the pharmaceutical industry** [online]. Symed Labs Assurance, Hyderabad, India, 2011. [capturado 06 fev 2012]; Disponível em: http://www.askaboutvalidation.com/scope-of-risk-management-for-pharmaceutical-industry/

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Archer L *et al*. **Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma.** J Clin Oncol. 2010 maio, 28(13):2137-43.

Rosenberg G. **A ISO 9001 na indústria farmacêutica: uma abordagem das boas práticas de fabricação.** Editora E-papers, 2000. 130 p.

Sambrook J. **Molecular cloning: a laboratory manual, third edition.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Sandle T. **Application of quality risk management to set viable environmental monitoring frequencies in biotechnology processing and support areas.** PDA J Pharm Sci Technol. 11 de janeiro de 2012;66(6):560–79.

Santos-Reyes J, Beard AN. **Assessing safety management systems.** Journal of Loss Prevention in the Process Industries. 2002;15(2):77–95.

Saunders GC, Parkes HC, Primrose SB. **Analytical molecular biology: quality and validation.** Royal Society of Chemistry; 1999.

Sen GC. **Viruses and interferons.** Annu. Rev. Microbiol. 2001;55:255–81.

SENAI – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. **Guia para elaboração do Plano APPCC; geral**. 2. ed. Brasília, SENAI/DN, 2000. 301 p.

Shimazaki T, Honda M, Kaneko S, Kobayashi K. **Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN-alpha correlates with a reduced La protein.** Hepatology. 2002 jan;35(1):199–208.

Southern EM. **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** Journal of molecular biology. 1975;98(3):503–17.

Srivastava P, Bhattacharaya P, Pandey G, Mukherjee KJ. **Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha 2b in *Escherichia coli*.** Protein Expr Purif 2005; 41: 313-322.

Stake RE. **The art of case study research.** SAGE; 1995. 196 p.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. **How cells respond to interferons.** Annu. Rev. Biochem. 1998;67:227–64.

Tague NR. **The Quality Toolbox, Second Edition**. ASQ Quality Press; 2010.

Tellis W. **Introduction to Case Study** [online]. 1997. [capturado 13 jan. 2012]. Disponível em: http://www.nova.edu/ssss/QR/QR3-2/tellis1.html

USP – United State Pharmacopeia. **USP 32- Nf 27** 2010, 3 Vol. Set. 1o ed. U.S Pharmacopeia; 2009.

Van Schothorst M. **Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures.** Food control. 1998;9(6):379–84.

Walsh G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology.** 2º ed. Wiley-Blackwell; 2003.

WHO – World Health Organization. **Water quality monitoring: A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes** [online]. WHO, 1996. [Capturado 09 fev. 2012]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/wqmonitor/en/index.html

WHO – World Health Organization. **World health report.** WHO Unpublished Document. WHO, Geneva, Switzerland. 1997.

WHO – World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. **Forty-seventh report, technical report series No. 878.** World Health Organisation, 1998; www.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=10&codcch=878.

WHO – World Health Organization. **The application of risk communication to food standards and safety matters, a joint FAO/WHO expert consultation** [online]**.** Rome, Italy, 2-6 February 1998. WHO. [citado 2012 fev 6]; Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/feb1998/en/index.html

WHO – World Health Organization. **WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations – Thirty-seventh Report.** WHO Technical report series 908. Geneva: 2003.

WHO – World Health Organization. **Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Vol. 2, Good manufacturing practices and inspection.** Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2007. 409 p.

WHO – World Health Organization. **Hazard analysis and critical control point generic models for some traditional foods: a manual for the eastern mediterranean region.** World Health Organization; 2010.

Wolter T, Richter A. **Assays for controlling host-cell impurities in biopharmaceuticals.** BioProcess Technical. 2005 fev; 40-46.

Yin RK. **Applications of case study research.** SAGE; 2011. 265 p.

Yin RK. **Case study research: design and methods.** Fourth Edition. Sage Publications, Inc; 2008. 240 p.

Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, *et al.* **Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy.** Ann. Intern. Med. 1999 ago 3;131(3):174–81.

Yu LX. **Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control.** Pharmaceutical Research. 2008 jan 10;25(4):781–91.