

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA**

CAMILA ELEOTERIO LOPES SOARES

**ANÁLISE DA PROPOSTA DE UM BIOPROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM
INTERMEDIÁRIO FARMACÊUTICO TENDO COMO BASE A RESOLUÇÃO DA
DIRETORIA COLEGIADA 17.**

**RIO DE JANEIRO
2014**

CAMILA ELEOTERIO LOPES SOARES

ANÁLISE DA PROPOSTA DE UM BIOPROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM INTERMEDIÁRIO FARMACÊUTICO TENDO COMO BASE A RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA 17.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Orientadora:

Prof(a) Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

**Rio de Janeiro
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

SOARES, CAMILA

Análise da proposta de um bioprocesso para obtenção de um intermediário farmacêutico tendo como base a Resolução da Diretoria Colegiada 17/ Camila Eleoterio Lopes Soares – 2014.

71 f.: il.; 30cm

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral

1. RDC 17.; 2. L-fenil-acetil-carbinol (L-PAC); 3. Benzaldeído; 4. Biofármacos. Teses. I. Amaral, Priscilla. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Análise da proposta de um bioprocesso para obtenção de um intermediário farmacêutico tendo como base a Resolução da Diretoria Colegiada 17

**ANÁLISE DA PROPOSTA DE UM BIOPROCESSO PARA
OBTENÇÃO DE UM INTERMEDIÁRIO FARMACÊUTICO TENDO
COMO BASE A RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA 17.**

Camila Eleoterio Lopes Soares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Aprovada por:

Orientadora

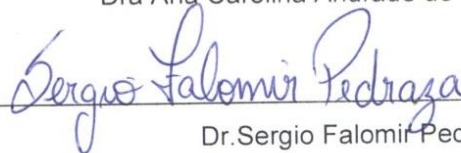


Prof^a. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc

Banca Examinadora



Dra Ana Carolina Andrade de Góes, D.Sc.



Dr. Sergio Falomir Pedraza, D. Sc.



Prof^a. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc

Rio de Janeiro, R.J. – Brasil

Abril /2014

Dedicatória

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Quando damos conta, já é tarde para lhes agradecer. Dedico ao meu **marido** Yuri em especial **aos meus avós** que são exemplos de garra e perseverança.

RESUMO

Soares, Camila Eleoterio Lopes. **Análise da proposta de um bioprocesso para obtenção de um intermediário farmacêutico tendo como base a Resolução da Diretoria Colegiada 17**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Os medicamentos apresentam uma peculiaridade na sua concepção de qualidade: devem ser registrados e fabricados apenas por fabricantes licenciados e autorizados, cujas atividades são regularmente inspecionadas pelas autoridades regulatórias competentes. O dispositivo para viabilizar esta particularidade são as normativas denominadas de Boas Práticas de Fabricação (BPF), RDC 17, aplicáveis a todas as operações envolvidas na fabricação de medicamentos, incluindo aqueles medicamentos em desenvolvimento destinados a ensaios clínicos. O estudo de caso foi realizado com o L- fenil acetil carbinol (L- PAC), um intermediário na produção de L- efedrina e pseudoefedrina, que são compostos farmacêuticos utilizados como descongestionantes e anti- asmáticos. Tendo como base a produção do Interferon alfa que já tem o seu processo industrial bem definido, o objetivo deste trabalho foi projetar uma planta industrial baseando-se nos dados experimentais obtidos em um biorreator de bancada, adotando como base uma produção anual de L-PAC de 150 kg e supondo o funcionamento dessa planta por 330 dias por ano. A partir disso, foi sugerida a implementação da tecnologia de sistemas de uso único onde são utilizadas bolsas plásticas descartáveis que são fornecidos pré-esterilizados, eliminando a necessidade de preparo e esterilizações prévias, bem como os procedimentos de limpeza posteriores, reduzindo também significativamente o consumo de água purificada. Para realização do dimensionamento dos reatores do processo foram propostos dois cenários de propagação de células e as seguintes conclusões foram alcançadas: no primeiro, considerou-se que 3 biorreatores de 20L cada para propagação de células (pré-fermentadores) estariam disponíveis para alimentar um fermentador de produção de 50 L e no segundo cenário tem-se disponível apenas um biorreator de propagação e um fermentador de produção de 100 L. Além disso para dar suporte à execução do processo produtivo, de acordo com a RDC-17, é necessário que as áreas de preparo de meios e as de processo sejam áreas limpas grau D, por não possuírem um alto risco de contaminação.

Palavras-chaves: L-efedrina, fermentação, RDC 17, L-fenil-acetil-carbinol (L-PAC), Benzaldeído e Biofármacos

Abstract

Soares, Camila Eleoterio Lopes. **Evaluation of a proposal for a bioprocess to obtain a pharmaceutical ingredient based on RDC 17** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

Medicines present particularities on their quality conception: must be registered and produced only by licensed and authorized companies, which activities are frequently verified by regulatory authorities. The tool that make possible these particularities are the rules name as Good Manufacturing Practice (GMP) and a set of rules named RDC-17, that are applicable to all steps involved in the medicines manufacturing, ant it includes products on development and clinical trial phases. This case of study was performed with L-phenylacetylcarbinol (L-PAC), an intermediate on L-ephedrine and pdeuoephedrine synthesis, which are pharmaceutical components used as decongestant and anti-asthmatic. Using as example the alpha interferon production that has a well-established industrial process, the aim of this work is to propose a design for an industrial site based on experimental results obtained in a bench scale bioreactor. This work adopts as basis a 150 kg of L-PAC/year production, and 330 working days/year. Here wherein were suggested single-use systems technologies. These systems are supplied ready to use, and they eliminate the need for cleaning before and after steps, the need for space and clean water consumption. During the process of bioreactors design two scenarios were proposed for cell propagation and it was concluded that: on the first, were considered that three bioreactors a 20 L (pre-fermenters) would be available to feed a 50 L production fermenter, and the second scenario presents only one pre-fermenter, with a 100 L production fermenter. Furthermore, according to RDC-17, to support this process this work defines that the areas for media preparation and process should be projected in grade D manufacturing area buy not to possess a high risk of contamination.

Keywords: L-ephedrine, Fermentation, RDC 17, L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC), benzaldehyde e biopharmaceuticals.

Sumario

1. Introdução:.....	1
2. Objetivo	3
2.1 Objetivos específicos	3
3. Revisão Bibliográfica	4
3.1 Recomendações relevantes da RDC 17 para processo produtivo	4
3.2 L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC).....	10
3.3 Banco de células	13
3.3.1 Técnicas de manutenção e armazenamento de leveduras.....	14
3.3.2 – Técnicas de manutenção e armazenamento de bactérias.....	18
3.4 – Processos industriais para produção de biofármacos	20
3.5 – Interferon	23
3.5.1 – Interferon alfa (IFN- α)	23
4– Metodologia	25
4.1 – Estudo de Caso	25
4.1.1 Desenvolvimento da Produção do L-PAC utilizando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4.1.1.1 Meios utilizados na produção	25
4.1.1.2 Preparos do pré-Inóculo (proliferação das células)	26
4.1.1.3 Inoculações no Biorreator de 1L	26
4.1.1.4 Extração de L-PAC do meio fermentado	26
4.1.1.5 Quantificações celular.....	27
4.1.1.6 Análises de Glicose	27
4.1.1.7 Análises L-PAC.....	27
4.1.2 Produção do biofármaco alfainterferona 2b em <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.2.1 Biorreação	28
4.1.2.1.1 Multiplicação	28
4.1.2.1.2 Pré -inoculo.....	29
4.1.2.1.3 Fermentação.....	29
4.1.2.2 Centrifugação	29
4.1.2.3 Ruptura Celular.....	30

4.1.2.4 Ressupensão celular	30
4.1.2.5 Desnaturação e centrifugação	30
4.1.2.6 Renaturação	30
4.1.2.7 Purificação	30
4.1.2.7.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos(IMAC)	30
4.1.2.7.2 Cromatografia de fase reversa(RPC).....	30
4.1.2.7.3 Cromatografia de Troca iônica(IEX).....	30
4.1.2.7.4 Cromatografia de gel filtração (GF) e Filtração esterilizante.	31
4.2 Cálculos para a previsão de uma planta industrial	31
5 Resultados e Discussões.....	32
5.1 Estudo de estabilidade dos meios	33
5.2 Processo ideal segundo a BPF.....	35
5.2.1 Preparo de meios	36
5.2.2 Multiplicação	36
5.2.3 Centrifugação	37
5.2.4 Produção de L-PAC.....	37
5.2.5 Recuperação do L-PAC.....	38
5.3 Controles do processo.....	39
5.3.1 Determinações da concentração do L-PAC e de glicose.....	39
5.3.1.1 Cromatografias de Fase Reversa (RPC)	39
5.3.1.2 Análises de glicose	40
5.4 Previsão de uma planta industrial.....	40
5.4.1 Esquema de propagação de células.....	41
5.4.2 Diagrama de blocos com a proposta de produção do L-PAC.....	46
6. Conclusão.....	50
7. Referência bibliográfica:	51

Agradecimentos

Não poderia deixar de relatar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração dessa dissertação.

Agradeço a Deus sem o qual não conseguiria chegar até aqui, pela força, paciência e fé nele depositada para enfrentar todos os obstáculos os quais tive que enfrentar durante estes três anos de estudo.

À professora Priscilla, minha orientadora. Pri, obrigada por ter confiado a mim esse projeto e por toda a dedicação e paciência nos meus momentos de desespero.

À Mariana, minha “co-orientadora” de coração, que me ajudou bastante na correção do meu trabalho e sem ela não conseguiria ter terminado.

Ao meu marido Yuri, por fazer parte desse sonho. Por acreditar me dar o incentivo necessário para nunca desistir. Por ser um grande companheiro e meu melhor amigo, além de me ajudar na elaboração das figuras.

A minha mãe e meu pai, pelo seu exemplo de dedicação e empenho, por acreditar e se orgulhar do meu trabalho, por ter me ensinado a dar valor a tudo àquilo que conquistamos com o nosso esforço e sacrifício.

À Fafá e aos meus irmãos Alan e Bianca que sempre acreditaram no meu potencial.

A minha família pela confiança em mim depositada, pelas orações e por sempre torcerem por mim.

Aos meus amigos, pelos seus elogios, broncas, e-mails, telefonemas, festas e por tornarem cada dia melhor.

Aos amigos do trabalho, por me aturarem, nos últimos dias que antecederam a minha defesa, pois eu estava com os “nervos” a flor da pele e em especial a Ana Maria, Isabelly e Aline que estavam sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Lista de Figuras

Figura 1 Conversão química do L-PAC em L-Ephedrine e D- Pseudoephedrine..	11
Figura 2 Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000)	12
Figura 3– Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. Fonte: http://qnint.sbg.org.br	28
Figura 4 Processo de centrifugação do interferon alfa 2b	29
Figura 5: Biorretor com o vaso de utilização única <i>BIOSTAT® STR</i> da empresa <i>Sartorius</i> . (A) biorreator fechado e (B) biorreator em corte. Fonte: http://www.sartorius.com/pt/produtos/bioreactores-fermentadores/utilizacao-unica/biostat-str/	38
Figura 6 Método de glicose oxidase	40
Figura 7 Esquema de propagação das células para a produção de L-PAC considerando o cenário 1	43
Figura 8 Esquema do processo de propagação das células para a produção do L-PAC considerando o cenário 2.....	46
Figura 9 Diagrama de bloco cenário 1	47
Figura 10 Diagrama de bloco cenário 2.	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 : Classificação de áreas limpas	8
Tabela 2 Sistemas de expressão para biofármacos: Vantagens e Desvantagens	22
Tabela 3 :Interferons aprovados pela ANVISA para o mercado brasileiro	24
Tabela 4 Legislações internacionais sobre estudo de estabilidade (EE).....	34
Tabela 5 Teste de esterilidade	35
Tabela 6 Teste de estabilidade meio rico YPD, meio de Produção de L-PAC e meio sólido GYMP.....	35

Lista de siglas e abreviaturas

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

B – Bateladas anuais

BCT – Banco de células de trabalho

BPF – Boas Práticas de Fabricação

C₁ – Cenário 1

C₂ – Cenário 2

DO - densidade ótica

EE – Estudo de estabilidade

EMA - European Medicines Agency

FDA - Food and Drug Administration

GF – Cromatografia de gel filtração

GMP –good manufacturing practice

GYMP – glicose, extrato de lêvedo, maltose e peptona

HEPA – hight efficiency particule air

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC na sigla inglesa)

ICH- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IEX – Cromatografia de troca iônica

IFN- Interferon

IMAC - Cromatografia de afinidade por íons

L-PAC - L-Fenil-acetil-carbinol

Mp – Produção anual de L-PAC

OMS - Organização Mundial da Saúde

P- Concentração de L-PAC

pH - potencial hidrogeniônico

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RPC – Cromatografia de fase reversa

RQ – Coeficiente Respiratório

VHC – Vírus da Hepatite C

YPD – Extrato de Lêvedo, Peptona e Glicose

1. Introdução:

Biofármacos são medicamentos produzidos por técnicas biotecnológicas com a utilização de um sistema vivo. Podem ser extraídos de órgãos e tecidos obtidos a partir de micro-organismo, fluidos animais ou a partir de células e micro-organismos modificados geneticamente. São mais eficazes do que os medicamentos convencionais obtidos por processos de origem química, possibilitando o tratamento de doenças crônicas nas quais há a ausência, diminuição ou perda de função de uma determinada proteína (CARREIRA *et al.*, 2013).

Os medicamentos apresentam uma peculiaridade na sua concepção de qualidade: devem ser registrados e produzidos apenas por fabricantes licenciados e autorizados, cujas atividades são regularmente inspecionadas pelas autoridades regulatórias competentes. O dispositivo para viabilizar esta particularidade são as normativas denominadas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) aplicáveis a todas as operações envolvidas na fabricação de medicamentos, incluindo aqueles medicamentos em desenvolvimento destinados a ensaios clínicos. As BPF são passíveis de atualização contínua, de forma a acompanhar a evolução de novas tecnologias. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pelo controle sanitário do país, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre Certificação de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (mecanismo que permite o comércio internacional de medicamentos) revisou e propôs um novo regulamento técnico na forma de uma Consulta Pública em 13 de Janeiro de 2009 e após 17 de abril de 2009 publicou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 17 de 16 de Abril de 2010.

O objeto de estudo deste trabalho é avaliar uma proposta de um processo industrial seguindo as diretrizes impostas pela norma. O processo escolhido para o estudo de caso foi a produção de L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC) que é um intermediário para a síntese de L-efedrina, pseudoefedrina, norpseudoefedrina (ELLIAH e KRISHNA, 1987). Estes são medicamentos usados como descongestionantes e antiasmáticos. L-PAC pode ser produzido por síntese

química a partir de cianohidrina, mas a rota de biotransformação a partir de benzaldeído é a preferida industrialmente (KHAN e DAUGULIS., 2012).

Para apresentar uma proposta de produção do L-PAC em escala industrial, é importante que se utilize algum outro processo similar já estabelecido na indústria como comparador das práticas, e instalações adotadas. O comparador adotado foi a alfainterferona 2b, que é obtida a partir de um bioprocessamento utilizando a bactéria *E. coli* recombinante.

A alfainterferona pertence a uma classe de citocinas que ocorrem naturalmente no corpo humano e por sua atividade antiviral, antitumoral e imunorreguladora, tornou-se de grande interesse farmacêutico. É o principal medicamento contra hepatite C, etiologia responsável por 70% dos óbitos por hepatites no Brasil. Atualmente é fornecido no Brasil, principalmente, pelas empresas Shering (PegIntron), Roche (Pegasys) e pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) (SOUZA, 2010).

A necessidade de produzir o L-PAC em escala industrial, deu a importância deste trabalho como fonte de informação não só para a etapa inicial de conservação das cepas, inerente a qualquer processo, como também para implementação de rotinas de processo que visam aplicação industrial.

2. Objetivo

Avaliar segundo a RDC 17, o processo de produção de L-PAC em escala de bancada (biorreator 1L), propor modificações aplicando as diretrizes previstas na RDC 17 e propor um processo industrial.

2.1 Objetivos específicos

- Adequar as áreas de produção tendo como base a RDC 17
- Identificar as qualidades e as vantagens da tecnologia de uso-único (single-use) onde são utilizadas bolsas plásticas descartáveis.
- Propor um fluxograma de processo industrial segundo as diretrizes da RDC 17, adequando os equipamentos para a produção de L-PAC levando em consideração dois cenários industriais.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Recomendações relevantes da RDC 17 para processo produtivo.

Dentro dos requisitos mínimos que a RDC 17 dispõe para o cumprimento das BPF, o fabricante pode adotar alternativas para acompanhar o avanço tecnológico ou atender necessidades específicas de um determinado produto desde que estes dispositivos sejam devidamente validados pelo fabricante. Esta inclui 37 definições relacionadas aos fitoterápicos, validação e qualificação entre outras. Acrescenta a implantação de um sistema de controle de mudanças e revisão periódica do desempenho do processo e da qualidade do produto dentro do sistema de Garantia de Qualidade. Com relação às atividades de qualificação e validação, a RDC 17 faz uma abordagem disposta em dez artigos (art.15 ao 25).

No que se referem às auto-inspeções sugere também que se proceda uma auditoria interna antes de uma inspeção de uma autoridade sanitária (art. 61). A RDC inclui também como itens de verificação os vestiários, o armazém e o transporte de produtos intermediários, o gerenciamento de resíduos e os sistemas computadorizados com relevância BPF (art. 62). A RDC 17 não ressalta a necessidade de se elaborar um relatório específico quanto às ações corretivas, mas dispõe que deve haver um programa eficaz de acompanhamento das ações decorrentes das auto inspeções (art. 66). Ainda sobre o tema auditoria, solicita que se deve implementar um programa de avaliação de fornecedores a serem incluídos na lista de fornecedores qualificados levando-se em consideração seu histórico e os materiais fornecidos (art. 67).

Outro fato importante a ser mencionado na norma é o Manual da Qualidade como um documento relevante da empresa (art. 20). Esta é uma tendência provavelmente advinda dos conceitos emitidos pelo guia ICH (*International Conference on for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) Q10, que descreve um modelo para um sistema efetivo de gestão da qualidade na indústria farmacêutica cujo instrumento para formatação desse processo é o Manual da Qualidade ou outro procedimento de documentação equivalente.

Sobre as instalações, a RDC 17 salienta nas operações que levam à dispersão de pós (amostragem, pesagem, mistura, processamento e embalagem) sejam tomadas as devidas providências quanto a evitar a contaminação cruzada provenientes dessas operações e garantir uma limpeza efetiva (art. 104). Indica também que as instalações devem ser planejadas para garantir o fluxo lógico de materiais e pessoal (art. 111). Menciona explicitamente que salas de descanso e refeitórios devem ser separadas das áreas de fabricação e controle de qualidade (art. 112). No armazenamento, a área de recepção de materiais deve ser preferencialmente separada da expedição, caso isto não ocorra, procedimentos para evitar misturas devem estar disponíveis e o pessoal treinado. Além disso, a área de recebimento de materiais deve permitir a limpeza adequada dos recipientes antes do armazenamento (art. 118). Para as matérias-primas altamente ativas e sensibilizantes, as áreas de produção, além de contarem com instalações exclusivas e separadas, devem prever a segregação entre estes materiais (art. 125) e devem estar munidas de eficiente sistema de exaustão e tratamento do ar (art. 126).

Quanto aos equipamentos destinados à fabricação, a RDC 17 recomenda a utilização de sistemas fechados como mais apropriado e, no caso de sistemas abertos ou exposição do produto em elaboração durante qualquer operação, devem ser tomadas as devidas precauções para minimizar a contaminação, o que implica em procedimento padronizado disponível e pessoal operacional devidamente treinado (art. 149). Já para os equipamentos não dedicados, a norma prevê limpeza conforme procedimento validado para evitar a contaminação cruzada (art. 150). No caso de equipamentos dedicados, devem ser utilizados procedimentos de limpeza validados, considerando resíduos de agentes de limpeza, contaminação microbiológica e produtos de degradação, quando aplicável (art. 151). Reforça também que os desenhos dos equipamentos e dos sistemas de suporte críticos devem ser mantidos atualizados.

Em se tratando de materiais, a norma cita dois tipos básicos: os relacionados com os processos produtivos (as matérias-primas, os materiais de embalagem, os gases, os solventes, os materiais auxiliares ao processo, os

reagentes e os materiais de rotulagem) (art. 153) e os materiais relacionados às operações paralelas aos processos produtivos tais como limpeza, lubrificação de equipamentos e controle de pragas e que estes últimos não devem entrar em contato direto com o produto (art. 154). Isto implica em um monitoramento contínuo de todos os materiais que circulam dentro das instalações da planta e uma avaliação de risco para todas as categorias dos materiais para evidenciar um estado de controle neste requisito. Quanto às matérias-primas, cita que os rótulos de identificação interna da companhia devem ser afixados nos recipientes de maneira que não prejudique a identificação original (art. 161). Na operação de fracionamento das matérias-primas abre a possibilidade de conferência de peso ou volume através de sistema informatizado (art. 168).

Traz recomendações explícitas sobre padrões de referência: devem ser utilizados padrões de referência oficiais ou, na ausência desses, padrões de referência devidamente caracterizados (art. 187); padrão de referência não adquirido de uma farmacopéia reconhecida deve ser cuidadosamente caracterizado através de procedimentos analíticos qualitativos e quantitativos mais extensos do que os utilizados para controlar o fármaco ou o medicamento a fim de garantir sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência (art. 188); devem os padrões serem utilizados e armazenados de acordo com as recomendações do fabricante (art. 190).

No critério de identificação dos utensílios, recipientes e salas durante as operações de produção, salienta a necessidade de se registrar o nome do produto processado anteriormente (art. 250). Na prevenção de contaminação cruzada, elege técnicas de insuflamento de ar e sistema de exaustão e uniformes protetores em todas as áreas de manipulação de produtos e materiais como exigência (art. 256). Faz referência que sejam limpos e secos os locais destinados à armazenagem dos equipamentos limpos (art. 262), e que também sejam definidos, com base em validação, os limites de tempo em que o equipamento ou recipiente permaneça sujo antes de ser realizado o procedimento de limpeza e após a limpeza antes de nova utilização. (art. 263).

Nas operações de embalagem, determina o registro da verificação da limpeza da linha de embalagem na interface entre dois processos como obrigatório (art. 271) e estabelece que a empresa trabalhe preferivelmente com rótulos em bobinas em detrimento dos rótulos avulsos e quando a operação de rotulagem for manual o controle durante o processo seja realizado com maior frequência (art. 275).

A RDC 17 passa a prever que os resultados fora de especificação obtidos durante os testes de materiais ou produtos (art. 292) e nos casos em que um produto não atenda as especificações deve ser sumariamente reprovado, não se cogitando a viabilidade de reprocessamento (item 16.4.2).

A RDC 17 classifica as operações de fabricação para produtos estéreis em duas categorias: a primeira, cujos produtos são esterilizados terminalmente e a segunda, em que parte ou todas as etapas do processo são conduzidas assepticamente. Passa a exigir que a esterilidade dos produtos acabados deva ser garantida pela validação do ciclo de esterilização ou por meio de simulação com meios de cultura dependendo do produto a ser esterilizado terminalmente ou fabricado assepticamente. Para a liberação do produto, a documentação do lote e os registros de monitoramento ambiental devem ser examinados em conjunto com os resultados dos testes de esterilidade. O procedimento do teste de esterilidade deve ser validado para cada produto e os métodos farmacopéicos devem ser utilizados para a validação e desempenho do teste de esterilidade (art. 309).

As áreas limpas utilizadas na fabricação de produtos estéreis são classificadas em quatro diferentes graus, sendo eles (tabela1):

I - grau A: zona de alto risco operacional, por exemplo, envase e conexões assépticas. Normalmente estas operações devem ser realizadas sob fluxo unidirecional. Os sistemas de fluxo unidirecional devem fornecer uma velocidade de ar homogênea de aproximadamente $0,45\text{m/s} \pm 20\%$ na posição de trabalho;

II - grau B: em áreas circundantes às de grau A para preparações e envase assépticos; e

III - grau C e D: áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis (art. 319).

Tabela 1 : Classificação de áreas limpas

Áreas limpas	
Grau A	Zona de alto risco operacional
Grau B	Áreas circundantes a de grau A.
Grau C	Áreas menos críticas com alto risco de contaminação.
Grau D	Realização de etapas menos críticas na fabricação.

A respeito da sanitização destas áreas, a RDC 17 prevê as seguintes exigências: os desinfetantes e detergentes utilizados nas áreas grau A e B devem ser esterilizados antes do uso ou ter sua esterilidade comprovada (art. 316); deve ser realizado um controle microbiológico das diferentes classes das áreas limpas durante a operação; quando forem realizadas operações assépticas, o monitoramento deve ser frequente e os métodos, tais como placas de sedimentação, amostragem volumétrica de ar e de superfícies devem ser utilizados; as áreas não devem ser contaminadas pelos métodos de amostragem utilizados; os resultados de monitoramento devem ser revisados para fins de liberação do produto terminado; superfícies e pessoal devem ser monitorados após a realização de operações críticas (art. 317); devem ser estabelecidos limites de alerta e de ação para a detecção de contaminação microbiológica, e para o monitoramento de tendência da qualidade do ar nas instalações (art. 318).

Para a manufatura dos produtos esterilizados terminalmente, o ambiente passa de grau C, exigido na RDC anterior, para grau D, com a ressalva de que quando o produto está sujeito a um alto risco de contaminação microbiana a preparação deve ser feita em ambiente grau C (art. 323). O envase deve ser feito

em um ambiente, no mínimo, grau C, porém quando o produto está sujeito a um risco de contaminação pelo ambiente, o envase deve ser realizado em ambiente grau A, circundado por uma área, no mínimo, grau C (art. 324). No caso das preparações assépticas, os materiais devem ser manuseados em um ambiente no mínimo grau D após a lavagem (art. 326). O manuseio de matérias primas estéreis e materiais, a não ser que sujeitos a esterilização ou filtração esterilizante, deve ser realizado em um ambiente grau A circundado por um ambiente grau B (art. 327). A preparação de soluções que são esterilizadas por filtração durante o processo deve ser realizada em uma área no mínimo grau C e caso as soluções não sejam esterilizadas por filtração, a preparação dos materiais e produtos deve ser feita em um ambiente grau A circundado por um ambiente grau B (art. 328). O manuseio e envase desses produtos, assim como o manuseio de equipamentos previamente esterilizados, deve ser feito em um ambiente grau A, circundado por um ambiente grau B (art. 329). A transferência de recipientes parcialmente fechados, tais como os utilizados em liofilização, deve ser realizada em ambiente grau A circundado por ambiente grau B antes de completamente fechados, ou a transferência deve ocorrer em bandejas fechadas, em um ambiente grau B (art. 330). A preparação e envase de pomadas, cremes, suspensões e emulsões estéreis deve ser feita em ambiente grau A, circundado por ambiente grau B, quando o produto é exposto e não é posteriormente filtrado (art. 331).

A validação dos processos assépticos deve incluir a simulação desses, utilizando meios de cultura em que a forma do meio de cultura utilizado deve geralmente ser equivalente à forma farmacêutica do produto, o processo de simulação deve imitar as operações de rotina, incluindo todas as etapas críticas subsequentes. As condições de pior caso devem ser consideradas na simulação e esta deve ser repetida em intervalos regulares e sempre que houver alteração significativa nos equipamentos e processos com um número de recipientes suficiente para assegurar a confiabilidade da avaliação, tanto que, para pequenos lotes, o número de recipientes utilizados na simulação deve ser no mínimo igual ao tamanho do lote do produto (art. 334).

Quanto às formas de esterilização, reforça que deve ser dada atenção especial quando forem utilizados métodos de esterilização que não estejam de acordo com aqueles descritos nas farmacopeias ou outros compêndios oficiais, bem como quando forem utilizados para a esterilização de produtos que não sejam soluções aquosas ou oleosas simples (art. 351). Estabelece que antes da adoção de qualquer processo de esterilização, a sua eficácia e sua adequabilidade devem ser comprovadas por meio de testes físicos (inclusive testes de distribuição e penetração de calor) e pelo uso de indicadores biológicos, no sentido de que sejam atingidas as condições de esterilização desejadas em todos os pontos de cada tipo de carga a ser processada (art. 352).

Na esterilização por calor, destaca que a temperatura deve ser conferida, preferencialmente, contra um segundo sensor de temperatura independente, localizado na mesma posição (art. 357) e que o fluído ou gás utilizado na fase de resfriamento que entre em contato direto com o produto ou material não deve ser fonte de contaminação microbiológica (art. 359). Especifica que a esterilização por calor seco é adequada para líquidos não aquosos ou produto em pó (art. 363). No processo asséptico e esterilização por filtração prevê a validação dos filtros para comprovação efetiva da esterilização nas condições reais de processo, sem causar alterações prejudiciais na composição do produto (art. 381). Recomenda a utilização de filtros esterilizantes redundantes (art. 382) e a realização do teste de integridade do filtro antes do uso e imediatamente após o uso (art. 384, 385, 386). Acrescenta que o mesmo filtro não deve ser utilizado por mais que um dia de trabalho, a menos que tal uso tenha sido validado (art. 388).

3.2 L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC)

O hidrocloreto de L-efedrina é um medicamento tradicional, obtido de extratos de plantas medicinais pertencente ao gênero *Ephedra*, tem sido usado por milhares de anos como remédio na China para induzir transpiração, suavizar a respiração e facilitar a excreção de urina. A efedrina foi, primeiramente, isolada em 1855, e o interesse internacional nessa droga foi estimulado pelas investigações clássicas da Chem&Schimidt em 1930, que publicou seus efeitos cardiovasculares

e suas semelhanças com epinefedrina (SHUKLA et al., 2002; ROSCHE et al., 2001).

L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC) é um intermediário para a síntese de L-efedrina, pseudoefedrina, norpseudoefedrina (ELLAIHAH E KRISHNA, 1987) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**1), que são compostos farmacêuticos usados como descongestionantes e antiasmáticos. L-PAC pode ser produzido por síntese química a partir de cianohidrina, mas a rota de biotransformação a partir de benzaldeído é preferida industrialmente.

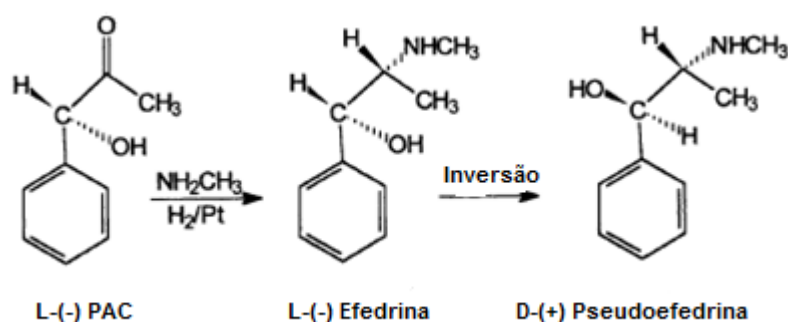


Figura 1 Conversão química do L-PAC em L-Ephedrine e D- Pseudoephedrine

A biotransformação de benzaldeído em L-PAC foi descrita primeiramente em 1921 utilizando levedura de panificação como micro-organismo produtor (NEUBERG E LIBERMAN, 1921).

A produção do L-PAC por biotransformação tem como via metabólica principal a glicólise, através do qual é gerado o piruvato (e conseqüentemente o “acetaldeído ativo”) que reage com o benzaldeído, na presença da enzima piruvato descarboxilase (Figura 2). Uma estratégia comum nos experimentos de produção de L-PAC é o controle do coeficiente respiratório (RQ, na sigla inglesa) de modo que ele alcance valores superiores a 1 (com 1 sendo o crescimento aeróbio usando carboidratos), como por exemplo de 4 até 7 no caso de *C. utilis*. Isso é alcançado com uma baixa aeração, embora ela não possa ser nula a fim de não comprometer a viabilidade global das células no meio (SHUKLA E KULKARNI, 2000).

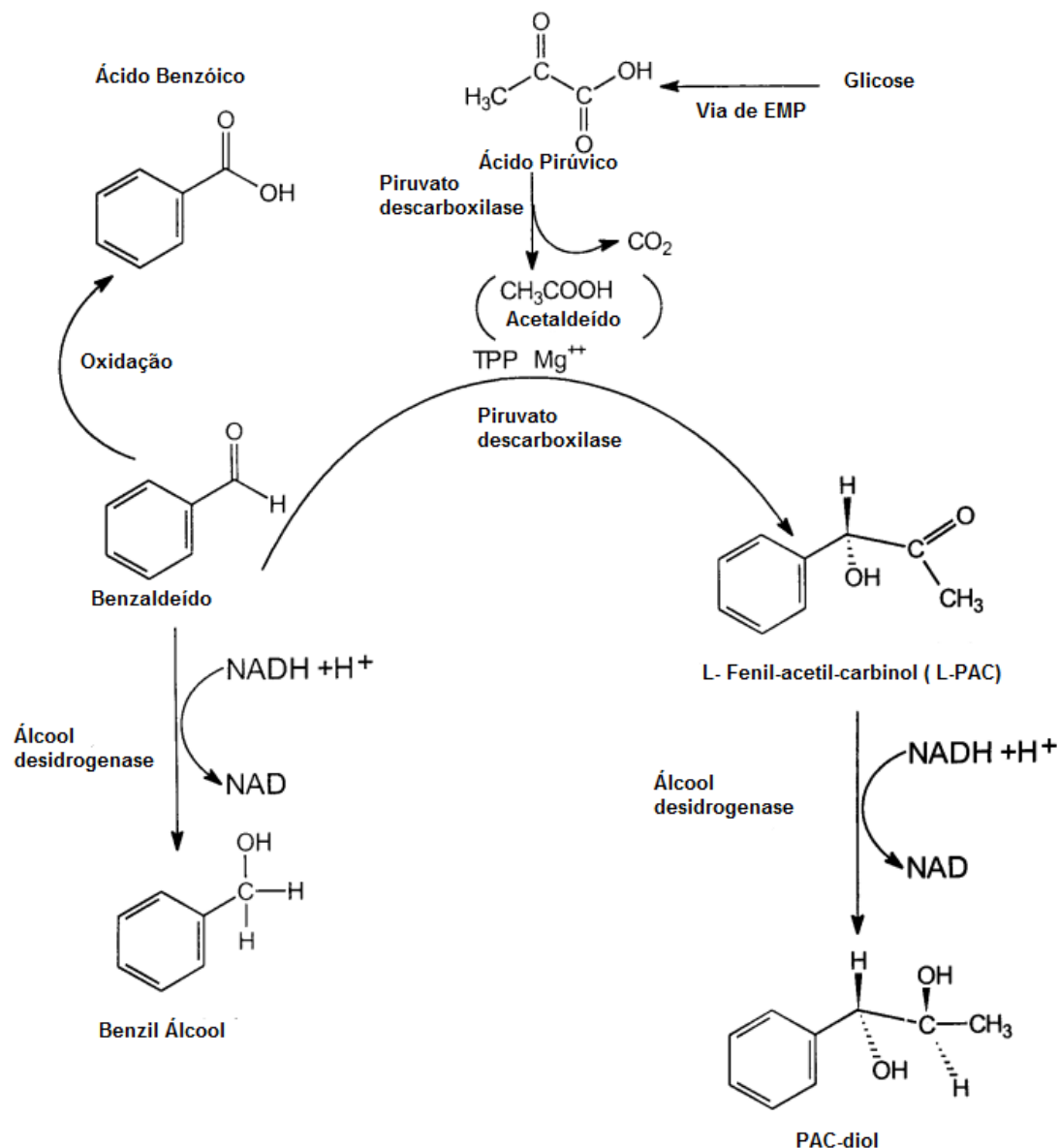


Figura 2 Reações bioquímicas comuns na produção de L-PAC (SHUKLA e KULKARNI, 2000)

Uma comparação entre vinte e duas cepas de 14 espécies na produção de L-PAC com uma única adição de benzaldeído (1g/L) mostrou que as maiores produções foram obtidas com *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Saccharomyces pastorianus* respectivamente 0.74 g/L, 1,75 g/L, 0,97g/L e 0.39 g / L de L-PAC, sugerindo que a produção de L-PAC depende do organismo e do seu estado metabólico

(MIGUEZ, 2012). Com quatro adições de benzaldeído, *S. carlsbergensis* produziu 5,6 g de L-PAC/ L). Essa espécie tem sido considerada a melhor produtora (VOET *et al.*, 1973). Na literatura reporta-se que bactérias, como *Zymomonas mobilis*, e fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, também são transformadores de benzaldeído, mas suas habilidades em produzir L-PAC são pequenas (SHUKLA E KULKARNI, 2000).

3.3 Banco de células

Os processos de isolamento, identificação, conservação e utilização de micro-organismos vêm sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU & TUTUNJI, 2004).

No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GIRÃO *et al.*, 2004).

As inúmeras pesquisas que envolvem leveduras e bactérias em diversos processos, desde pesquisas clínicas com espécies patogênicas até a aplicação biotecnológica, ampliaram as exigências por cepas que possam ser depositadas em coleções de cultura, aumentando a demanda pela manutenção de micro-organismos em culturas (KAWAMURA *et al.*, 1995).

De acordo com Oplustil (2004), estudos com finalidade clínica, epidemiológica ou científica necessitam a qualquer tempo de cepas de micro-organismos para exames complementares e essa demanda faz com que exista a necessidade de se manter a viabilidade dos mesmos por períodos variáveis. O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, da importância do acervo e, principalmente, na

capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos (ABREU & TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Diante da necessidade de preservação de micro-organismos, muitas vezes, busca-se conservar um agente que foi selecionado e melhorado com intuito de manter sua nova identidade. Ainda assim, o objetivo da manutenção de um micro-organismo não é somente conservar seu estado inicial evitando mutações indesejáveis, mas também garantir ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (PAOLI, 2005; OKAFOR, 2007).

3.3.1 Técnicas de manutenção e armazenamento de leveduras

Como são organismos unicelulares, as leveduras podem ser manipuladas em laboratório de forma semelhante à maioria das bactérias, mas com exigências nutricionais e ambientais normalmente mais simples. Em geral, leveduras são micro-organismos fáceis de manter, estocar, cultivar e isolar a partir de diferentes habitats. Embora elas sejam tolerantes a condições desfavoráveis, muitos métodos de manutenção, comumente utilizados, resultam em baixos níveis de sobrevivência e instabilidade das suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. A estocagem de leveduras também apresenta algumas particularidades, como a transição entre forma leveduriforme e micelial, no pleomorfismo, além de risco de contaminação. Embora não se tenha pleno conhecimento dos fatores que afetam a sobrevivência das leveduras estocadas, a baixa viabilidade celular pode estar relacionada, em parte, ao grande tamanho das células em relação às células bacterianas e a ausência de esporos de resistência dos tipos encontrados nos fungos superiores. Entretanto, alguns métodos elementares podem ser utilizados no dia a dia de um laboratório de forma simples, tomando-se certas precauções, o que torna possível o alcance de altas taxas de sobrevivência, para manutenção destes micro-organismos (SPENCER & SPENCER, 1996; KIRSOP & SNELL, 1984).

Coleções de leveduras, originalmente eram mantidas pela transferência seriada de meios de cultura velhos para meios novos. Este método, embora

simples, é trabalhoso e consome um tempo relativamente grande, além de ser economicamente inadequado. No entanto, ele pode ser ainda muito útil para culturas não muito numerosas, destinadas ao uso constante. Ao longo dos anos, vários métodos de preservação têm sido desenvolvidos visando à eliminação dos problemas encontrados em transferências seriadas. O principal objetivo que se busca com tais métodos, é a extensão do tempo de sobrevivência das cepas mantidas armazenadas. Os métodos que tem apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial. (GENTLES & SCOTT, 1979; KIRSOP & SNELL, 1984).

A escolha da técnica a ser empregada deve ser definida, seguindo-se alguns parâmetros. Para curtos períodos de manutenção, quando se pretende o uso diário, meios enriquecidos e de formulação indefinida, como o meio extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) e o ágar extrato de malte é comumente utilizado. Para períodos longos de preservação, como em coleções de culturas, onde o acesso imediato é menos importante, devem-se buscar métodos que promovam melhor manutenção das características das espécies e das cepas, quando este é o objetivo primário (SPENCER & SPENCER, 1996).

Quando se objetiva armazenar leveduras por longos períodos, sugere-se a liofilização, o congelamento com meio adicionado de glicerol em freezer a -70°C ou o uso do nitrogênio líquido. O congelamento em meio adicionado de glicerol é um método que tem sido bastante difundido, sendo considerado equivalente à liofilização e à manutenção em nitrogênio líquido, permitindo longos períodos de armazenagem. O glicerol funciona como crioprotetor e deve ser adicionado de forma a se obter concentrações finais que podem variar entre 15 e 50% (SPENCER & SPENCER, 1996).

O processo de liofilização de micro-organismos envolve seu congelamento prévio à baixíssimas temperaturas seguido da secagem da amostra à vácuo. Tanto o congelamento como a liofilização são técnicas frequentemente utilizadas para preservação e estocagem de material biológico. Para se obter bons resultados com a liofilização, alguns fatores devem ser observados, como a

escolha do meio de crescimento da cultura inicial, do meio de reativação e a temperatura de pré-congelamento, entre outros (ROSE, 1970).

Este processo é bastante agressivo e apresenta alguns efeitos indesejáveis, tais como a desnaturação de proteínas e o decréscimo da viabilidade de diversos tipos celulares. Para se prevenir e reduzir estes efeitos adversos, substâncias protetoras tais como leite desnatado, sacarose, glicerol, dimetilsulfoxido, entre outras, são comumente adicionados às amostras antes de serem congeladas ou liofilizadas (DINIZ-MENDES et al., 1999). O dissacarídeo trealose foi mencionado como uma substância que apresenta um papel de reserva de carboidrato e como protetor da membrana citoplasmática contra secagem, congelamento e tensão de calor. Este carboidrato tem sido utilizado com sucesso na preservação de diferentes tipos celulares ao serem submetidos a tratamentos em baixas temperaturas. Hirasawa et al. (2001) demonstraram que o índice de tolerância ao congelamento entre leveduras de panificação aumentou quando estas foram saturadas com trealose exógena. Como é um crioprotetor natural que pode ser encontrado intracelularmente em muitas espécies de organismos, tais como leveduras e esporos de fungos, algumas cepas de leveduras apresentam produção de trealose em níveis elevados e, portanto, são naturalmente tolerantes ao congelamento. Esta característica é explorada na obtenção de produtos de panificação congelados, em que se utilizam leveduras tolerantes ao congelamento (HINO et al., 1990; LESLIE et al., 1995; TAKAGI et al., 1997).

Foi demonstrado que, a utilização da liofilização para armazenamento de leveduras pode ser de grande utilidade, pois geralmente esses organismos se mantêm inalterados morfológicamente e fisiologicamente e fiéis às propriedades industriais, embora outros autores tenham citado que mudanças genéticas podem ocorrer (SOUZU, 1973; KIRSOP & SNELL, 1984). No processo de liofilização, é essencial que se dê atenção ao emprego do meio adequado, sendo que alguns autores sugerem o “skin milk” (leite desnatado) para proteção das culturas (ELLIS & ROBERSON, 1968; QIANGQIANG et al., 1998). O meio com leite desnatado pode ser utilizado como agente protetor e também na re-hidratação das células, com significativa melhora dos resultados.

Para manutenção de leveduras por períodos medianos de tempo, são sugeridos a estocagem em meio inclinado sob óleo mineral, ou impregnação em papel de filtro, seguida de secagem do mesmo. A secagem sem congelamento pode também ser um recurso muito útil. O método mais simples é a secagem em papel de filtro, porém com restrições para alguns gêneros de micro-organismos (ANTHEUNISSE et al., 1981). A secagem em sílica gel pode ser considerada uma técnica mais conveniente e menos onerosa em relação à liofilização, com bons resultados.

A adição de óleo mineral ao cultivo em meios convencionais, crescido em temperaturas normais de incubação, proporciona uma atmosfera com baixos níveis de oxigênio. Este método está sujeito a alguns problemas encontrados nas transferências seriadas, e apresentam a desvantagem de serem facilmente contaminados. (KIRSOP & SNELL, 1984).

Como são vários os métodos de armazenamento que se destinam à preservação de uma infinidade de grupos de micro-organismos, quando se deseja a manutenção de uma dada característica específica, variações na forma de armazenamento devem ser testadas para a obtenção de melhores resultados. Com o objetivo de manter a habilidade de cepas de *Schizosaccharomyces pombe* e de *Saccharomyces cerevisiae* para transformação, Suga et al. (2000) desenvolveram um método de criopreservação destes organismos utilizando sorbitol como protetor ao invés de glicerol ou dimetilsulfóxido, conseguindo células viáveis por até 9 meses.

É mencionado na literatura que o método de escolha para o armazenamento de cepas de micro-organismos tem influência direta na expressão de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, e pode, inclusive, promover alterações genéticas (KIRSOP & SNELL, 1984; ABADIAS et al., 2001). A manutenção das características morfológicas e fisiológicas das cepas, bem como a preservação de suas propriedades, são atualmente alvos de preocupação por parte dos pesquisadores, ao se empregar o armazenamento de cepas para diferentes finalidades, desde coleções de culturas, pesquisas, estudos

taxonômicos e uso industrial. Entretanto, informações científicas precisas neste sentido ainda são escassas.

3.3.2 – Técnicas de manutenção e armazenamento de bactérias

A técnica de repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório. Por ser uma das mais antigas técnicas de conservação, tem sido bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

O método consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, incubação em ambiente favorável à multiplicação e estocagem em baixas temperaturas, após sua multiplicação. Nesta situação, é aconselhável o armazenamento de culturas sob refrigeração (5 a 8°C), em busca da redução do metabolismo dos microrganismos e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas, proporcionando a conservação de leveduras em média de um a três meses e de bactérias em torno de cinco a doze meses (COSTA & FERREIRA, 1991; GREEN, 2008).

Canhos *et al.* (2004) e Costa *et al.* (2009) afirmaram que a técnica de manutenção em óleo mineral proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura, em consequência da diminuição de oxigênio. Diversas bactérias podem ser conservadas por esta técnica, sendo armazenados com sucesso por dois a três anos, visto a redução na atividade metabólica e nas transferências para outros meios de cultura. Entretanto, comparando com outros métodos, apresenta desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo (esterilização e manuseio).

Considerando a manutenção de bactérias por liofilização, verifica-se que a viabilidade relativa após a liofilização decresce entre as bactérias formadoras de esporos, Gram positivas e Gram negativas, algas fato facilmente explicado pelas diferenças na morfologia. Miyamoto-Shinohara (2008) ao avaliarem a taxa de sobrevivência das bactérias Gram positivas imediatamente após a execução da

liofilização, verificaram maiores índices, quando comparado às Gram negativas, sobas mesmas condições, sugerindo desta forma maior resistência à desidratação pelas Gram positivas, provavelmente pela sua estrutura celular diferenciada. Quanto à avaliação durante o período de estocagem, observaram também que a taxa de sobrevivência de algumas espécies se mantém fixa com o passar do tempo, enquanto a de outras espécies apresentam um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta dos 15 anos.

O índice de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* reduziu cerca de 10% imediatamente após a liofilização. No entanto, os índices de sobrevivência não diminuíram muito durante o período de armazenamento por 10 anos. As bactérias Gram positivas apresentaram maiores índices de sobrevivência que as Gram negativas. Para as bactérias Gram negativas, a sobrevivência de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* e *Alcaligenes faecalis*, foi cerca de 50%, onde a redução ocorreu nos primeiros cinco anos e posteriormente se estabilizou em cerca de 10% (MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2000).

Dentre as espécies avaliadas, pelos autores supra mencionados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após recuperação da desidratação, apresentou apenas 8% de sobrevivência. Quando avaliada posteriormente, apresentou os melhores índices dentre todos os microrganismos testados, alcançando uma taxa de sobrevivência de 97,7% por ano. Quanto às bactérias Gram negativas, na avaliação feita após a liofilização, as espécies *Escherichia coli*, apresentaram sobrevivência de 42,6%, revelando índices maiores que o observado para *S. cerevisiae*, contudo a perda subsequente à estocagem foi superior a encontrada para *S. cerevisiae*, com taxas de sobrevivência anual correspondendo a 91%.

Considerando a manutenção de bactérias por criopreservação levou-se em consideração que diante da forte influência que a taxa de resfriamento exerce sobre a viabilidade celular, DUMONT *et al.*, (2004) verificaram em seu estudo a viabilidade de cinco tipos celulares (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e uma célula humana da linhagem leucocitária K562) frente a diferentes taxas de resfriamento, durante a

criopreservação. Classificaram a viabilidade celular em três escalas: alta viabilidade para baixas taxas de resfriamento (5 a 180°C/min), permitindo o fluxo do conteúdo de água celular, prevenindo a cristalização intracelular; baixa viabilidade para taxas intermediárias de resfriamento (180 a 5.000°C/min), levando a prevalência do fluxo de calor sobre o fluxo de água e a consequente cristalização (onde o fluxo de água está em direção ao meio externo); e alta viabilidade para taxas de resfriamento muito altas, onde há indução de um rápido fluxo de calor com consequente vitrificação intracelular, antes mesmo do fluxo de água.

Os referidos autores verificaram que para os tipos celulares investigados a viabilidade mostrou-se maior nas taxas de resfriamento baixas e muito alta. Nos casos de taxas mais baixas de resfriamento, o calor latente de congelamento da água celular permitiu a saída de água e preveniu desta forma, a formação de cristais de gelo no espaço intracelular. As taxas intermediárias de resfriamento conferiram um retardo na vitrificação intracelular, e se caracterizaram fator negativo para a viabilidade do espécime, levando a morte celular decorrente aos danos pela cristalização durante o fluxo de água pela membrana plasmática. Já nas altas taxas de resfriamento, as células foram capazes de se congelar, sem qualquer alteração no volume celular e apresentaram viabilidade considerável após descongelamento. Apesar do comportamento geral dos espécimes envolvidos, os resultados podem ser alterados por influência do tamanho da célula, presença de parede celular e permeabilidade à água (DUMONT et al., 2004).

Atualmente, crioprotetores como a sacarose, trealose, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), vem sendo utilizados na criopreservação de micro-organismos, nas concentrações de 10% a 15%, garantindo a viabilidade de agentes como *Escherichia coli* (BAATI et al., 2000).

3.4 – Processos industriais para produção de biofármacos

Os biofármacos são muito similares ou idênticos às proteínas humanas sendo utilizados para reposição destas proteínas no paciente. Uma das principais

vantagens do uso de biofármacos em relação ao uso de proteínas purificadas a partir de amostras biológicas humanas, como ocorre no caso de fatores sanguíneos de coagulação usados para hemofílicos, é que estes medicamentos são muito mais homogêneos e seguros, não apresentando o risco de possuir algum vírus ainda desconhecido, e que não foi detectado pelos testes disponíveis atualmente. A vantagem se deve ao fato destas proteínas serem produzidas dentro de um processo rigidamente controlado e com o mínimo de variabilidade entre os lotes, de forma a gerar estruturas proteicas completas e homogêneas, que minimizam ao máximo possíveis reações imunológicas nos pacientes. O primeiro biofármaco desenvolvido para uso humano foi a insulina, produzida na bactéria *Escherichia coli* e aprovado para comercialização nos Estados Unidos em 1982(CARREIRA et al.,2013).

Os biofármacos podem ser produzidos por inserção do DNA recombinante na célula ou por estímulos para produção de substâncias contidas na própria célula como mostra a Tabela 2e cada uma tem as suas vantagens e desvantagens (CARREIRA et al., 2013).

Tabela 2 Sistemas de expressão para biofármacos: Vantagens e Desvantagens

SISTEMAS	VANTAGENS	DESvantagens
BACTÉRIAS	<ul style="list-style-type: none"> - Genética e fisiologicamente bem caracterizadas - Rápido crescimento <i>in vitro</i>. - Processos fermentativos bem descritos e controlados - Facilidade de manipulação genética. - Custo de produção baixo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausência de maquinaria para adição de modificação pós-traducionais. - Deficiência no dobramento proteico. - Necessidade de eliminação de toxinas e de pirógenos durante o processo de purificação. - Possibilidade de agregação proteica.
LEVEDURAS E FUNGOS	<ul style="list-style-type: none"> - Meio de cultivo simples e barato. - Rápido crescimento <i>in vitro</i>. - Livre de endotoxinas oncogênicas e partículas virais. - Bem caracterizado geneticamente. - Alta eficiência de produção. 	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão de glicosilação diferente do esperado podendo tornar a proteína não funcional. - Alta degradação proteolítica. - Processo de escalonamento para produção industrial ainda desconhecido em fungos.
CÉLULAS DE INSETO	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de manutenção das células. - Rápida obtenção da proteína de interesse. - Livre de endotoxinas oncogênicas e partículas virais. - Modificações pós traducionais e desdobramento proteico mais complexos. - Facilidade de purificação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão de glicosilação diferente de proteína de mamífero podendo tornar a proteína pouco funcional. - Expressão transitória da proteína. - Degradação proteica. - Proteínas processadas incorretamente.
CÉLULAS DE MAMÍFEROS	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a expressão de proteínas complexas e com alta massa molecular. - Padrão de glicosilação idêntico ou muito similar ao das proteínas humana. - Correto dobramento e processamento da proteína. - Baixa imunogenicidade da proteína produzida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para seleção de células superprodutoras. - Cultivo de alto custo e trabalhoso. - Necessidade de equipamentos dispendiosos. - Rendimento modesto. - Possibilidade de contaminação viral.
PLANTAS TRANSGÊNICAS	<ul style="list-style-type: none"> - Maior economia e biossegurança. - Escalonamento bastante viável - Padrão de glicosilação similar ao das proteínas humana. - Produto livre de pirógenos, endotoxinas e príons. - Maior estabilidade das proteínas produzidas 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para seleção de células transgênicas. - Baixo nível de expressão. - Cultivo difícil e trabalhoso. - Variabilidade na expressão. - Tecnologia pouco estudada
ANIMAIS TRANSGÊNICOS	<ul style="list-style-type: none"> - Maior produtividade em comparação a expressão de células de mamíferos. - Padrão de glicosilação similar ao das proteínas humana. 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo período para seleção de animais transgênicos - Altos custos com a manutenção dos animais. - Purificação da proteína é complicada devido a presença de outras proteínas do animal. - Questões éticas (bem estar do animal) e de biossegurança (transmissão de patógenos) são entraves.

Fonte: CARREIRA et al., 2013.

3.5 – Interferon

A Sociedade Internacional para Pesquisa de Interferon e Citocinas dividiu os interferons em três classes principais, de acordo com sua origem e o tipo de receptor com o qual interagem. Tipo I formam uma superfamília de citocinas produzidas pelo sistema imune inato. Pertencem a este tipo o IFN- α (com 13 subtipos) entre outros, tais como o IFN- β . Todos os subtipos de IFN- α são secretados por leucócitos, enquanto que IFN- β é também produzido por fibroblastos. Tipo II, o único descrito até o momento é o IFN- γ , descoberto em 1965 e é produzido exclusivamente por células do sistema imune adaptativo, tais como células T e *natural killers* (NK), após estímulos ocorridos nas respostas iniciais do sistema imune inato (CHEVALIEZ e PAWLOTSKI, 2007). O tipo III, classificado e também denominado como interleucina 28/29 e como IFN- λ , apresenta atividades similares ao IFN, porém exerce sua atividade através de receptores mais complexos e distintos do IFN tipo I. Seus mecanismos de ação antiviral não estão completamente descritos, mas estudos observaram que pode ser produzido por monócitos macrófagos, células dendríticas e que sua produção é também estimulada pela ação de IFN- α . (ANK et al., 2006).

3.5.1 – Interferon alfa (IFN- α)

O IFN- α humano, além do amplo espectro de ação antiviral, possuem também ação antiproliferativa e imunomodulatória sobre diversos tipos de células. Embora descobertos no final da década de 1950, tornaram-se disponíveis para obtenção em grande escala somente mais de duas décadas depois, com a expressão do IFN- α -2b humano recombinante em *Escherichia coli* a partir da tecnologia de DNA recombinante, com alto nível de pureza, permitindo sua aplicação de maneira eficaz contra diversas enfermidades. Diversos subtipos de IFN- α foram clonados, mas somente IFN- α -2a e 2b foram comercializados (CINDRIC et al., 2006; HERNANDEZ, et al, 1998; RADHAKRISHNAN et al., 1996).

O IFN- α ativa genes celulares que resultam na produção de proteínas que conferem às células uma condição antiviral. De um modo geral, o mecanismo do

sistema interferon é composto de duas etapas: a “indução/produção” e a “ação”. Ao entrar na célula, o vírus expõe seu material genético. No caso do vírus da hepatite C (VHC), o RNA segue para replicação e construção de novas partículas virais que deixam a célula. O novo material genético formado envia um sinal para o núcleo da célula, levando ao processamento de genes de interferon e sua produção. O interferon produzido é eliminado pela célula e alcança a célula vizinha, onde é internalizado e inicia a sinalização para a produção de proteínas antivirais, paralisando a replicação do vírus (BILLIAU, 2006; KAYSER et al. ,2005). Uma vez que são degradados pelo ácido gástrico e enzimas proteolíticas, os interferons devem ser administrados por via intramuscular ou subcutânea. São amplamente e rapidamente distribuídos pelos tecidos do corpo, com concentrações mais elevadas ocorrendo nas células esplênicas, nos rins, fígado e pulmões. Entretanto, estudos apresentam os rins como principal sítio de metabolismo do IFN, sendo esta a sua principal rota de eliminação. Uma quantidade considerável de IFN é eliminada pela urina, enquanto os metabolismos de excreção hepática e biliar são rotas minoritárias de eliminação. Com isso, a meia-vida do interferon no organismo é de 3 a 8 horas após a aplicação no paciente (THITINAN e McCONVILLE, 2009). Existem 11 interferons aprovados pela ANVISA conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 :Interferons aprovados pela ANVISA para o mercado brasileiro

Nome	Ingrediente	Empresa	Fabricante
Roferon A	IFN alfa 2a	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA	F. Hoffman La Roche (Suíça)
Interferon alfa 2a	IFN alfa 2a	Blausiegellnd e Comércio LTDA	Shenyang Sunshine (China)
Heberon Alfa R	IFN alfa 2b	Cubanacan Comércio Internacional	CIGB (Cuba)
Intron A	IFN alfa 2b	Ind Química e FarmacêuticaScheringPloug AS	Schering Plough (Irlanda)
Interferon alfa 2B HU R	IFN alfa 2b	Biosintética Farmacêutica LTDA	Biosidus (Argentina)
Kinnoferon 2 A	IFN alfa 2a	Lab Químico Farmacêutico Bergamo LTDA	Dong A Pharmaceutical (Coréia)
Blaufferon-B	IFN alfa 2b	Blausiegellnd e Comércio LTDA	Laboratórios Pablo Cassará SRL (Argentina)

Interferon Alfa 2a Humano Recombinante	IFN alfa 2a	ChronEpigenInd e Comércio LTDA	Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co., LTD (China)
Pegasys	IFN alfa 2a peguilado	Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos SA	F. Hoffman La Roche
PegIntron	IFN alfa 2b peguilado	Ind Química e Farmacêutica ScheringPlougS.A.	Schering Plough
Alfainterferona 2b humana recombinante	IFN alfa 2b	Bio-Manguinhos/FIOCRUZ	Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Fonte: Souza, 2010

4- Metodologia

A metodologia de pesquisa utilizada é quanto ao fim, descritiva e quanto aos meios, comparativa e estudo de caso.

4.1 – Estudo de Caso

4.1.1 Desenvolvimento da Produção do L-PAC utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Será descrito o processo de produção de L-PAC em escala de bancada (biorreator 1L) realizado atualmente pelo grupo de engenharia de sistemas biológicos da Escola de Química na UFRJ. A partir desse processo será sugerido um processo industrial tendo como base a RDC 17.

4.1.1.1 Meios utilizados na produção

YPD: meio de crescimento rápido - 1% de extrato de levedo, 2% de peptona, 2% de glicose – crescimento celular é limitado pela exaustão da fonte carbono.

GYMP: meio de estocagem e plaqueamento - 2% Glicose, 0,5% Extrato de Levedo, 0,3% Extrato de Malte, 0,5% de Fosfato de Sódio monobásico, 2% Agar.

Meio de Produção de L-PAC: O meio de produção foi formulado segundo Zhang et al (2008). Composição: Glicose 25 g/L; Peptona 20 g/L; Extrato de Levedo 10 g/L; MgSO₄.7H₂O 1 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,05 g/L; Na₂HPO₄ 35 g/L, Ácido Cítrico 10,7 g/L e Benzaldeído 1 g/L.

4.1.1.2 Preparos do pré-Inóculo (proliferação das células)

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido GYMP inocula-se, de forma estéril com uma alça de platina, 100 mL de meio de cultivo YPD em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL. Após cerca de 24 horas em um incubador rotatório a 30°C, 200 rpm, a absorbância (570 nm) de uma amostra deste cultivo é determinada e, em seguida as células são centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 7 minutos e ressuspensas em meio de cultivo YPD servindo de inóculo para a produção do L-PAC. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, $30,0 \pm 0,1$ mg m.s. cel/ mL nos meios de cultivo. (Miguez, 2013)

4.1.1.3 Inoculações no Biorreator de 1L

Biorreator (*Tecnal, TEC-BIO-C*) com capacidade de 1 L contendo sistema de aeração, agitação e controle de temperatura era provido de sistema contendo uma turbina do tipo Rusthon e outra do tipo Smith. O monitoramento e aquisição de dados de velocidade, pH, temperatura e oxigênio foi feito com auxílio do *Software TEC-BIO-C*. O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um sistema de aeração submerso através de 14 orifícios na haste de agitação. Antes de entrar no biorreator, o ar atravessava um filtro (*HEPA-VENT, Whatman*) com porosidade de 0,45µm para evitar a contaminação do meio.

Para produção de L-PAC no biorreator foram inoculados 750 mL da suspensão celular em meio de produção com 1 mL de anti espumante antifoam 204 (Miguez 2013). As condições de operação são aeração 2 vvm por 1 hora, agitação 350 rpm, e alimentação de glicose e benzaldeído (monitoradas através das análises enzimática e cromatográfica, respectivamente).

4.1.1.4 Extração de L-PAC do meio fermentado

O L-PAC é extraído utilizando uma modificação dos métodos de Smith e Hendlin (1953) e Long *et al.* (1989). O meio fermentado (45 mL) é extraído com a

metade do volume de solvente tolueno (22,5 mL) e a fração do solvente é separada. Este processo é repetido por quatro vezes. As quatro frações de solventes separadas são misturadas e evaporadas à vácuo a 90°C para um volume menor que 10 mL.

4.1.1.5 Quantificações celular

As suspensões celulares são quantificadas através de leituras das absorvâncias em espectrofotômetro, a 570nm, e transformadas em massa de células secas através de um fator de conversão, obtido pelo método Peso Seco (OLIVEIRA et al., 2010).

4.1.1.6 Análises de Glicose

A glicose é analisada pelo método de glicose oxidase (RAABO E TERKILDSEN,1960).

4.1.1.7 Análises L-PAC

O substrato, o produto e os sub-produtos são analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 3) em coluna ODS Hipersil C18 (5 µm, 250× 4.6 mm) conforme descrito por Roche et al. (2001). A fase móvel consiste numa mistura de acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v / v) segundo metodologia descrita por Zhang *et al.* (2008).A concentração de substrato e a concentração de subprodutos foram determinadas por comparação com uma amostra padrão.

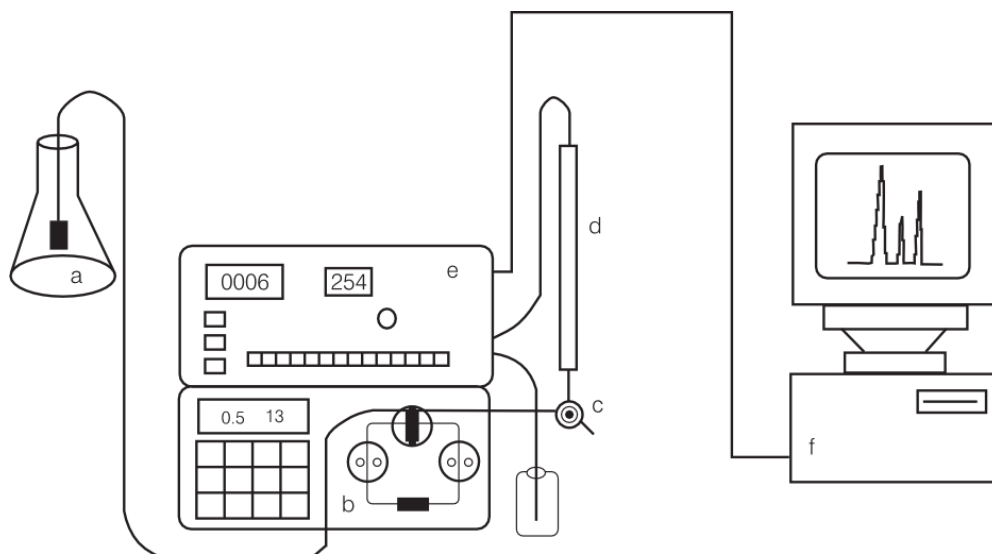


Figura 3– Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. Fonte: <http://qnint.s bq.org.br>

A validação do método cromatográfico para a quantificação do L-PAC, do Benzaldeído e dos Subprodutos da Reação de Biotransformação é feita da a partir da preparação de padrões de benzaldeído, L-PAC, benzil Álcool, e ácido benzóico, nas concentrações iniciais de 0,1g/L, 0,25g/L, 0,5g/L e 1,0g/L para ser executado a cromatografia por três operadores para se ter a robustez do método.

4.1.2 Produção do biofármaco alfainterferona 2b em *Escherichia coli*.

4.1.2.1 Biorreação

As áreas de biorreação são classificadas segundo a BPF como classe C por se trabalhar nas mesmas com micro-organismos vivos.

4.1.2.1.1 Multiplicação

A multiplicação das células de *E-coli* na produção do interferon alfa 2b tem uma duração de 30 horas que se dividem em duas etapas: semeadura em placa que é realizada a partir do banco de células de trabalho e na inoculação posterior ao crescimento das colônias em *Erlenmeyer*.

4.1.2.1.2 Pré -inoculo

A transferência da multiplicação de células é feita através de bolsas descartáveis e estéreis (Sartorius) para o fermentador de 60L sendo a duração do cultivo de 4 horas.

4.1.2.1.3 Fermentação

A transferência do pré-inoculo para o fermentador de 400L é feita através de tubulação de aço inox e o cultivo dura 14 horas.

4.1.2.2 Centrifugação

A transferência do fermentador para a centrifuga é feita através de tubulação de aço inox e a centrifugação do cultivo ocorre a 15000 rpm em uma centrifuga semicontinua, após 4 horas retira-se o rotor e em baixo de fluxo laminar retira-se a biomassa do rotor e coloca em uma bolsa estéril que será armazenada em um freezer a menos 20, conforme esquema da figura 4.

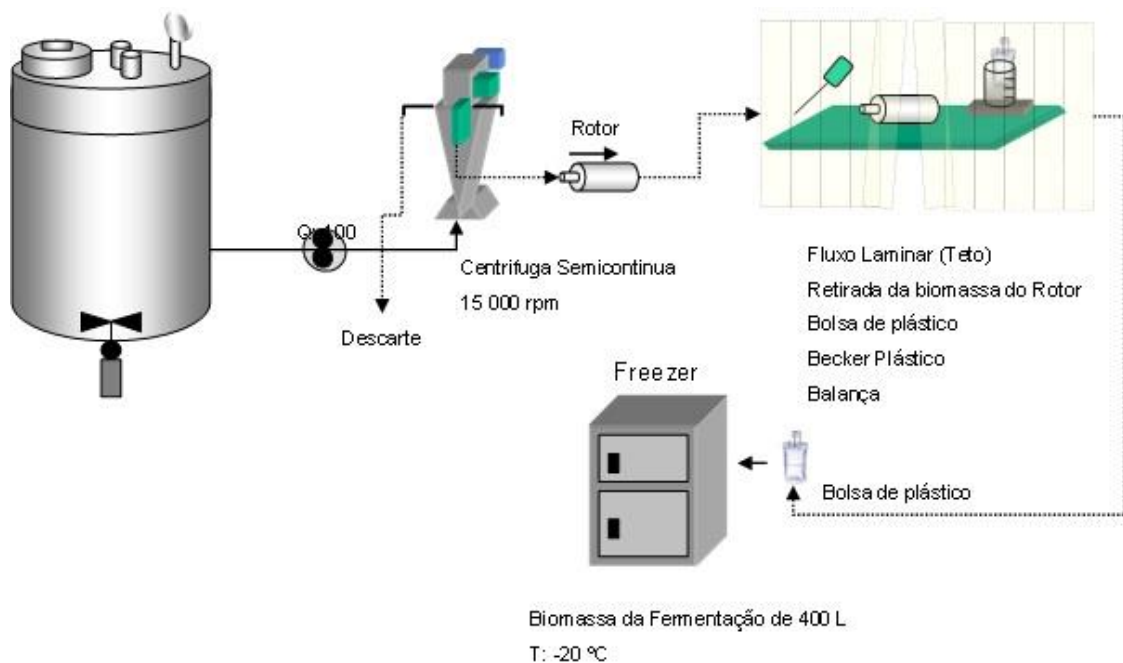


Figura 4 Processo de centrifugação do interferon alfa 2b

4.1.2.3 Ruptura Celular

A ruptura celular ocorre através do auxílio de um homogeneizador de alta pressão com uma duração de 20min. Após a ruptura são realizadas 3 processos de lavagem com tampão e após cada lavagem ocorre uma nova centrifugação.

4.1.2.4 Ressuspensão celular

Ressuspensão da proteína em tampão e transferência das mesmas em bolsas descartáveis e estéreis (Sartorius) para a desnaturação.

4.1.2.5 Desnaturação e centrifugação

A desnaturação tem uma duração de 4 horas e 30 minutos que são distribuídos no descongelamento da biomassa (800g), na adição de tampão e de ditiotreitol (DTT) e agitação por 2 horas. Após esse processo ocorre uma centrifugação que dura 4 horas onde é coletado o sobrenadante.

4.1.2.6 Renaturação

Transferência do sobrenadante para um tanque de 44 litros onde ocorre o bombeamento do tampão de renaturação por um período de 12 horas, após esse processo ocorre uma filtração em cartucho de 0,45µm.

4.1.2.7 Purificação

4.1.2.7.1 Cromatografia de afinidade por íons metálicos(IMAC)

A IMAC neste processo tem uma duração de 15 horas.

4.1.2.7.2 Cromatografia de fase reversa(RPC)

Esse processo tem uma duração de 09 horas e tem como solvente orgânico a acetonitrila + TFA (trifluoracético) 0,05%.

4.1.2.7.3 Cromatografia de Troca iônica(IEX)

A troca iônica no processo é utilizada para troca de tampão e sua duração é de 10 horas.

4.1.2.7.4 Cromatografia de gel filtração (GF) e Filtração esterilizante.

Essa cromatografia também é utilizada no processo para a troca de tampão e sua duração é de 14 horas. Logo após a gel filtração ocorre a filtração esterilizante.

4.2 Cálculos para a previsão de uma planta industrial

Como o tempo para propagação das células no pré-fermentador (24 h) é superior ao tempo do bioprocessamento de produção do L-PAC (6,5 h), dois cenários foram considerados. (1) No primeiro (c1), considerou-se que 3 biorreatores de propagação de células (pré-fermentadores) estariam disponíveis para que fosse possível ter a cada 10,5 horas o que corresponde a soma dos tempos de carga, de produção e de descarga do biorreator e células suficientes para o bioprocessamento (biorreator de produção). (2) No segundo cenário (c2), tem-se disponível apenas um biorreator de propagação (pré-inóculo) e, por isso, o tempo considerado para o processo é o do reator de propagação (24 h) somado ao tempo de carga e descarga.

Os cálculos realizados neste estudo foram baseados em Sato (2001).

O cálculo do número de bateladas anuais (B) é feito através dos dias de funcionamento da planta (Df) por ano multiplicado por 24 que é o número de horas que tem um dia dividido pelo tempo de produção (tp), que foi determinado conforme descrito anteriormente, somado ao tempo de carga (tc) que é um tempo estimado de 1,5 h, e descarga (td) que é 2,5 h levando em consideração a sanitização do equipamento, segundo a equação:

$$(B) = \frac{Df \times 24}{t_p + (t_c + t_d)} \quad (1)$$

Para calcular o volume do reator para a produção (V₁) de L- PAC é necessário dividir a quantidade da produção anual de L-PAC (Mp) pelo número de bateladas

anuais multiplicado por 1000 dividido pela concentração de L-PAC (P) multiplicado pelo número de bateladas (B) segundo a equação:

$$(V_1) = \frac{Mp \times 1000}{B \times P} \quad (2)$$

Para calcular o volume do reator de propagação (V_2) anterior ao bioprocessamento é necessário multiplicar o volume do reator de produção (V_1) por 40 e dividi-lo por 100 para se obter 40% do volume total do reator de produção.

$$(V_2) = \frac{V_1 \times 40}{100} \quad (3)$$

Para calcular o volume do *Erlenmeyer* ou reator de inoculo (V_3) é necessário multiplicar o volume do reator de propagação (V_2) por 25 e dividir por 100 para obter 25% do volume do reator de propagação.

$$(V_3) = \frac{V_2 \times 25}{100} \quad (4)$$

Para calcular o volume do *Erlenmeyer* de reativação (V_4) das células é necessário multiplicar o volume do *Erlenmeyer* de inoculo (V_3) por 10 e dividir por 100 para obter 10% do volume do *Erlenmeyer* de inoculo.

$$(V_4) = \frac{V_3 \times 10}{100} \quad (5)$$

5 Resultados e Discussões

Quando o objetivo é um aumento de escala devemos saber que as condições em escala industrial são diferentes das condições encontradas no laboratório. (BOMMARIUS, 2004).

Tendo como base a produção de Alfa-interferona 2b resumidamente descrita no estudo de caso foram sugeridas as adequações para a produção de L-PAC descritas a seguir.

5.1 Estudos de estabilidade dos meios

Alguns testes são necessários para se utilizar determinados meios de cultura em processos industriais. Estes testes são englobados no chamado estudo de estabilidade.

Chama-se estabilidade a capacidade de um composto em manter suas propriedades químicas, físicas, biológicas e microbiológicas dentro dos parâmetros especificados durante seu prazo de validade. A estabilidade de todos os compostos envolvidos nos processos produtivos, desta forma, verifica-se que a avaliação da estabilidade é essencial para garantir a qualidade e eficácia de todos os produtos farmacêuticos (REISDORFER, 2011).

Considera-se estudo de estabilidade (EE) o conjunto de testes realizados para adquirir informações sobre a estabilidade de produtos quanto aos limites previamente especificados, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de estocagem determinadas (RDC 59, 2010).

Os EE são fatores indispensáveis na etapa de registro de produtos biológicos além de serem parte integrante das BPF. Como legislação nacional sobre EE tem-se a RE 1/2005, que publicou o guia para a realização de EE (BRASIL 2005^a apud REISDORFER, 2011) e que revogou a RE 398/2004.

Os critérios internacionalmente estabelecidos pelo Mercosul e pela OMS também são utilizados pela ANVISA. Consideram-se referências complementares, os critérios estabelecidos pela *European Medicines Agency* (EMA), *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e *Food and Drug Administration* (FDA) conforme tabela 4 (REISDORFER, 2011).

Tabela 4 Legislações internacionais sobre estudo de estabilidade (EE)

LEGISLAÇÕES INTERNACIONAIS SOBRE ESTUDO DE ESTABILIDADE

1. ICH Q1A (R2): "Stability Testing of New Drug Substances and Products" (ICH 2003a)
 2. ICH Q1B: "Stability Testing: Photostability of New Drug Substances and Products" (ICH 1996a)
 3. ICH Q1C: "Stability Testing for New Dosage Forms" (ICH 1996b)
 4. ICH Q1D: "Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drugs Substances and Products" (ICH 2002)
 5. ICH Q1E: "Evaluation of Stability Data" (ICH 2003b)
 6. ICH Q1F: "Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV" (ICH 2003c)
 7. ICH Q5C: "Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products" (ICH 1995)
 8. "Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines" (WHO 2006a)
-

Fonte: Reisdorfer, 2011.

Os testes sugeridos para o processo são:

- ✓ pH (potencial hidrogeniônico): indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade das amostras de meio de cultura.
- ✓ Esterilidade: objetiva verificar a presença ou ausência de contaminação bacteriana e fúngica nas amostras de meio de cultura (tabela 5).
- ✓ Promoção de crescimento: Os meios de cultura possuem em sua composição uma reunião de componentes que são capazes de proporcionar o desenvolvimento da maioria dos contaminantes. No entanto, estas propriedades inerentes ao meio de cultura poderão sofrer alterações devido ao aquecimento excessivo, longas estocagens ou transporte. Para a determinação dessas possíveis alterações, é realizado o teste de promoção de crescimento que visa verificar as propriedades promotoras do crescimento microbiano, dos meios de cultura.

Tabela 5 Teste de esterilidade

MICROORGANISMO	MEIO DE CULTIVO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	TEMPO DE INCUBAÇÃO
Bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas	THI (Tioglicolato)	30-35°C	14 dias Leituras: 3°, 7° e 14° dias
Bactérias e fungos (meio de amplo espectro)	TSB (Caldo caseína)	20-22°C	14 dias Leituras: 3°, 7° e 14° dias

Os testes, em cada meio de cultivo, devem ser realizados segundo a Figura 6, onde mostra que no meio de produção de L-PAC não é feita a promoção de crescimento devido ao mesmo ser utilizado somente para estimular a produção do L-PAC e as células no decorrer do processo acabam morrendo e no meio GYMP não foi feito o pH devido a ser um meio sólido.

Tabela 6 Teste de estabilidade meio rico YPD, meio de Produção de L-PAC e meio sólido GYMP

Tempo(dias)	Meio YPD (3 lotes)	Meio de Produção de L-PAC (3 lotes)	Meio GYMP (3 lotes)
0			
15	Esterilidade,		Esterilidade,
30	Promoção de	Esterilidade,	Promoção
45	crescimento,	Aspecto e pH.	de
60	Aspecto e		crescimento
90	pH.		e Aspecto.

5.2 Processo ideal segundo a BPF

Todos os equipamentos e processos executados dentro de uma área produtiva têm que ser validados, inclusive os softwares utilizados, segundo a RDC 17. Os dispositivos devem atender as BPF, que no mundo é chamada de *good manufacturing practice*(GMP).

5.2.1 Preparo de meios

O preparo dos meios ocorrerá em uma sala com grau D. Segundo a RDC 17 estas são áreas onde são realizadas as etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis, por isso a classificação das áreas de produção de um insumo farmacêutico deverão ter essa classificação e, na área de entrada e saída de material deverá ter uma autoclave validada. Todo o material para uso dentro da área tem que ser estéril para alcançar o grau D e o número de trocas de ar deve ser apropriado ao tamanho da sala, aos equipamentos nela existentes e ao número de pessoas que nela trabalhem.

Para volumes inferiores a 30L, os reagentes serão dissolvidos com o auxílio de uma barra magnética em frascos ou garrafões, fechados e colocados para agitar sobre agitador magnético e para volumes de até 200 L serão preparados em tanques de polipropileno com bolsas plásticas descartáveis e estéreis e os reagentes serão dissolvidos com a ajuda de agitador mecânico de hélice.

As soluções e meios de culturas serão esterilizados por filtração. A filtração estéril ocorre sob um fluxo unidirecional, utilizando um sistema de filtração (mangueiras e cápsulas filtrantes). O líquido será recolhido em bolsas apirogênicas providas de mangueiras para volumes maiores de 50L (neste caso serão utilizados carrinhos de transporte para bolsas (*palletank*) e as saídas das bolsas serão seladas em seladora.

5.2.2 Multiplicação

Tendo como base a RDC 17, a sala para a preparação do pré-inóculo e do inóculo devem conter uma cabine de segurança biológica classe II tipo A. Este equipamento é projetado com o fluxo de ar interior com uma velocidade (75-100 ifpm) para proteger os funcionários, um fluxo de ar laminar vertical filtrado pelo sistema HEPA (*high efficiency particule air*) para a proteção do produto e com o ar de saída, exaustão, filtrado pelo sistema HEPA para proteção do meio ambiente. As cabines são classificadas em dois tipos A e B baseadas na construção, velocidades e padrões de fluxo de ar e nos sistemas de exaustão. Basicamente as cabines do tipo A são adequadas para as pesquisas microbiológicas na ausência

de substâncias químicas voláteis ou tóxicas e de rádio nucleotídeos, uma vez que o ar é recirculado dentro da cabina.

As roupas utilizadas na produção devem ser apropriadas ao processo e à classificação da área limpa onde os funcionários estiverem trabalhando, no caso grau D: o cabelo, a barba e o bigode devem estar cobertos. Devem ser usadas vestimentas protetoras e sapatos fechados próprios para a área ou protetores de calçados.

5.2.3 Centrifugação

O processo de centrifugação terá que ser realizado sob fluxo laminar para não ter o risco de lançar aerossóis no ambiente tendo como base o processo utilizado na produção do Interferon.

5.2.4 Produção de L-PAC

O biorreator mais indicado, do ponto de vista da BPF, para o processo em questão é um biorreator que utiliza bolsa flexível, por ser um biorreator descartável que tem como principal objetivo minimizar o risco de contaminação. Contém grande variedade de portas para alimentação, colheita e amostragem, além de economizar bastante tempo de sanitização do seu processo. A camisa do biorreator é de aço inox e o usuário só realiza a troca das bolsas, os volumes dessas bolsas flexíveis podem variar de 12,5 a 1000L. Como exemplo comercial tem-se o *BIOSTAT® STR* da empresa *Sartorius*, como mostra a Figura 5. Neste caso, a bolsa flexível que representa o vaso reacional, chamado *CultiBag STR*, tem um desenho clássico de um biorreator, e contém um agitador pré-instalado com possibilidade de se utilizar turbina com três lâminas ou turbina a disco com 6 lâminas.



A



B

Figura 5: Biorreator com o vaso de utilização única *BIOSTAT® STR* da empresa Sartorius. (A) biorreator fechado e (B) biorreator em corte. Fonte: <http://www.sartorius.com/pt/produtos/bioreactores-fermentadores/utilizacao-unica/biostat-str/>

As funcionalidades principais desse equipamento, segundo o fabricante, englobam:

- Sensores de pH e a densidade ótica (DO) de utilização única.
- Sistema de aeração composto por 6 linhas de gaseificação independentes.
- Até 6 controladores de fluxo de massa
- Visualização do processo através do visor de tendências de 6 parâmetros.
- Alarme de segurança para superaquecimento e alta pressão.
- Medição direta de pressão no interior do saco de utilização única
- Possível comunicação com computador de supervisão e controle.

5.2.5 Recuperação do L-PAC

Para a recuperação do L-PAC produzido por fermentação recomenda-se a utilização de aldeídos aromáticos, como p-anisaldeído, m-tolualdeído e p-hidroxibenzaldeído. Long e Ward (1989) recuperaram o L-PAC através de uma extração do meio com éter, remoção de ácido com NaHCO_3 aquoso, formação do complexo carbinol e aldeído com metabissulfito de sódio; produção de aldeído e

carbinol livres pela adição de NaHCO_3 sólido e separação em uma coluna de sílica gel. Para a realização deste processo em escala industrial é necessário se ter na sala de extração uma capela química, dependendo do volume manuseado instalações a prova de ignição.

Outro protocolo de purificação de L-PAC envolve a extração com dietil éter seguido de pré-tratamento em resina de troca iônica para recuperação de L-PAC em condições frias (SHUKLA e KULKARNI, 1999). Para esta purificação ser realizada em condição fria será necessário a construção de uma câmara fria para a realização deste processo dentro da mesma e os funcionários deveram utilizar EPI's específicos para trabalho em baixas temperaturas, tais como casacos.

Khan et al. (2012) extraíram o L-PAC do meio fermentado utilizando tolueno (proporção 1:2 amostra: tolueno) em funil de separação. Para a realização deste processo em escala industrial é necessário se ter na sala de extração uma capela química e dependendo do volume manuseado instalações a prova de ignição.

5.3 Controles do processo

5.3.1 Determinações da concentração do L-PAC e de glicose

Para a determinação da concentração de L-PAC e dos seus sub-produtos é necessário realizar uma purificação. Antes de aplicar qualquer amostra no HPLC tem que filtrar a mesma em filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

5.3.1.1 Cromatografias de Fase Reversa (RPC)

A cromatografia de fase reversa é uma cromatografia líquida onde o suporte ou a fase estacionária é formada por partículas de sílica ou resinas orgânicas as quais se prendem um significativo número de grupamentos apolares do tipo fenil, butil, octanoil ou octadecil. O objetivo é adsorver com forças diferenciadas uma população de peptídeos ou proteínas dessorvidos, seletivamente, quando da eluição, em uma coluna de fase reversa ocorre por um gradiente crescente de concentração de um solvente orgânico tais como, acetonitrila, iso-propanol, metanol e outros (Silva Júnior, 2004).

No caso do processo em questão a sugestão é utilizar a acetonitrila como solvente (Zang et al., 2008) e para isso é necessário que a sala aonde será realizada essa purificação tenha as tomadas, que iram conectar o HPLC, a prova de explosão e que tenha uma capela de exaustão para a manipulação do solvente e um detector de concentração de acetonitrila no ambiente. A coluna mais indicada é a C8 e o volume de injeção é de 20 μ L..

5.3.1.2 Análises de glicose

A glicose é analisada pelo método de glicose oxidase (Figura 6) (RAABO E TERKILDSSEN,1960).

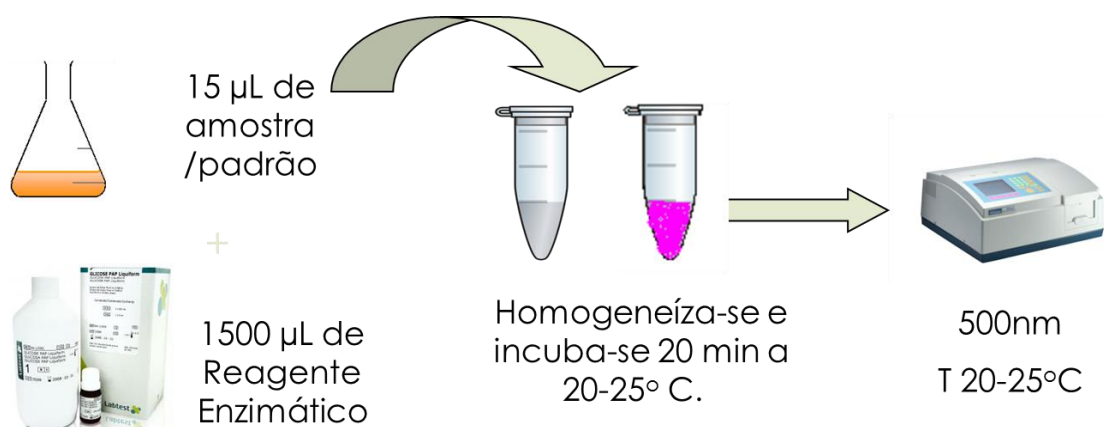


Figura 6 Método de glicose oxidase

Esse método foi o escolhido devido a ser um método barato e que tem uma resposta rápida.

5.4 Previsão de uma planta industrial

De forma a projetar uma planta industrial baseando-se nos dados experimentais obtidos em um biorreator de bancada (Miguez et al. 2014) tomou-se como base uma produção anual de L-PAC de 150 kg e supôs-se o funcionamento dessa planta por 330 dias por ano.

Miguez et al. (2014) reportaram uma produção de 6,9 g/L de L-PAC em biorreator de 1L após 6,5 h de fermentação utilizando o meio descrito por Zang et al. (2008) tendo uma concentração inicial de células de 30 g/L e alimentação de

glicose e benzaldeído é realizada após 1,5 h e 3 h do início do cultivo. Essas alimentações são feitas de forma intermitente com uma solução concentrada de glicose (previamente esterilizada) e de benzaldeído em quantidade suficiente para se elevar a concentrações de benzaldeído e glicose, respectivamente para 3,5 g/L e 30 g/L após 5 h de cultivo para 3,5 g/L e 12 g/L.

Segundo Miguez et al. (2014) os sub-produtos gerados ao final do bioprocesso são benzaldeído (2,53 g/L), biocatalizador (36,44 g/L), ácido benzoico (3,99 g/L) e benzil álcool (0,18 g/L).

5.4.1 Esquema de propagação de células

Baseando-se em dados experimentais do cultivo da cepa em questão foram propostos dois esquemas para a propagação de células um para cada cenário proposto anteriormente (MIGUEZ *et al.*,2014). Para determinar o número de bateladas anuais da produção foi utilizada a equação (Eq. 1) descrita anteriormente.

Considerando o cenário 1:

$$(B_{c1}) = \frac{330 \times 24}{6,5 + (1,5 + 2,5)} = 754,3 \text{ bateladas}$$

Para determinar o volume mínimo do reator de produção do L-PAC foi utilizada a equação (Eq 2) descrita anteriormente.

$$(V_1)c_1 = \frac{150 \times 1000}{754,3 \times 6,9} = 28,8 \text{ L}$$

Como os volumes de bolsas flexíveis com certificado GMP disponíveis no mercado é restrito, para esse caso o volume indicado é de uma bolsa de 50L.

Segundo os dados de laboratório (não publicados) é possível obter 75 g/L de células no pré-fermentador. Portanto para se obter 30 g/L de células em um biorreator de 10 L é necessário um pré-fermentador de 4 L, ou seja 40% do

volume do biorreator de produção. A partir disso, o volume do biorreator de processo sendo de 28,8 L o volume do reator de propagação anterior ao bioprocesso, utilizando a Eq. 3, deve ser:

$$(V_2)c_1 = \frac{28,8 \times 40}{100} = 11,5 L$$

Para se obter 5 g/L no início da batelada alimentada no pré-fermentador contendo 2 L inicialmente é necessário 1L de pré-inóculo com 10 g/L de células portanto o pré-inóculo deve ter 25% do reator de propagação.

O volume do reator de propagação anterior ao bioprocesso sendo de 11,5L o volume do *Erlenmeyer* de inoculo, utilizando a Eq. 4, deve ser:

$$(V_3)c_1 = \frac{11,5 \times 25}{100} = 2,9 L$$

O volume do *Erlenmeyer* de inoculo sendo de 2,9L o volume do *Erlenmeyer* de reativação, utilizando a Eq.5, deve ser:

$$(V_4)c_1 = \frac{2,9 \times 10}{100} = 0,29 L$$

O processo de propagação de células consiste em uma reativação das células em um *Erlenmeyer* de 1 L com 290 mL de meio por 6 horas em shaker. Depois esse volume será dividido em proporções iguais em 3 *Erlenmeyer* de 2L com um volume total (em cada um) de 0,822 L (inóculo + meio YPD). Esse processo é realizado por 24 h através de uma batelada alimentada intermitente com alimentação de uma solução de glicose (400 g/L) para uma concentração final de 20 g/L a cada 6 horas, obtendo-se um volume final em cada *Erlenmeyer* de 0,967 L. Em seguida, o último biorreator de propagação de células (biorreator de bancada) deve ser inoculado com o volume total da etapa anterior (2,9 L completando-se o volume até 5,75 L com meio YPD. Esse processo consiste em

uma batelada alimentada com vazão constante de 400 g/L de glicose, 40 g/L de peptona e 20 g/L de extrato de lêvedo após uma batelada simples inicial de 2 horas. O processo tem duração total de 24 horas, obtendo-se o volume final de 11,5 L. O cultivo é então centrifugado por 4 horas e logo após o sobrenadante é descartado e o rotor levado a um fluxo laminar para ser retirada a biomassa e a mesma ser colocada em uma bolsa estéril de 50L aonde será adicionado 28,8L de meio de produção e que será conectada ao biorreator de produção que tem duração de 6h e 30min, segundo o esquema da Figura **Erro! Fonte de referência não encontrada.7.**

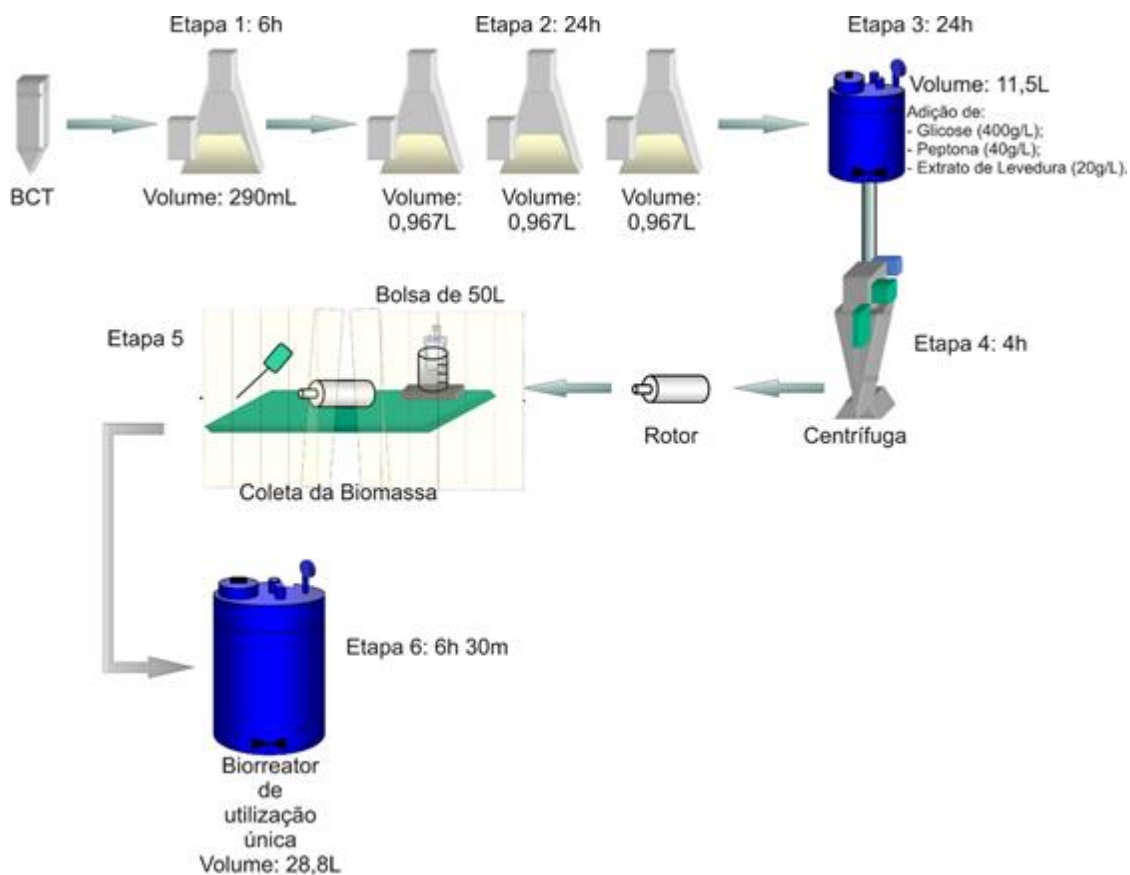


Figura 7 Esquema de propagação das células para a produção de L-PAC considerando o cenário 1

Considerando o cenário 2:

Para determinar o número de bateladas anuais da produção foi utilizada a equação (Eq. 1).

$$(B_{c2}) = \frac{330 \times 24}{24 + (1,5 + 2,5)} = 282,9 \text{ bateladas}$$

O volume do biorreator para a produção de L-PAC foi calculado utilizando a Eq. 2.

$$(V_1)c_2 = \frac{150 \times 1000}{282,9 \times 6,9} = 76,9 \text{ L}$$

Como os volumes de bolsas flexíveis com certificado GMP disponíveis no mercado é restrito, para esse caso o volume indicado é de uma bolsa de 100L.

O volume do biorreator de processo sendo de 76,9L o volume do reator de propagação anterior ao bioprocessamento, utilizando a Eq. 3, deve ser:

$$(V_2)c_2 = \frac{76,9 \times 40}{100} = 30,7 \text{ L}$$

O volume do reator de propagação anterior ao bioprocessamento sendo de 30,7L o volume do reator de inoculo, utilizando a Eq.4, deve ser:

$$(V_3)c_2 = \frac{30,7 \times 25}{100} = 7,7 \text{ L}$$

O volume do reator de inoculo sendo de 7,7L o volume do *Erlenmeyer* de reativação, utilizando a Eq. 5, deve ser:

$$(V_4)c_2 = \frac{7,7 \times 10}{100} = 0,77 L$$

O processo de propagação de células consiste em uma reativação das células em um *Erlenmeyer* de 2 L com 0,77 mL de meio por 6 horas em shaker. Depois esse volume será transferido para um biorreator descartável de 10L com um volume total de 6,54 L (inoculo + meio YPD). Esse processo é realizado por 24 h e é uma batelada alimentada intermitente com alimentação de uma solução de glicose (400 g/L) para uma concentração final de 20 g/L a cada 6 horas, obtendo-se um volume final de 7,7 L. Em seguida, o último biorreator de propagação de células que também é descartável, deve ser inoculado com o volume total da etapa anterior (7,7 L completando-se o volume até 15,27 L com meio YPD. Esse processo consiste em uma batelada alimentada com vazão constante 0,698 L/h de uma solução contendo 400 g/L de glicose, 40 g/L de peptona e 20 g/L de extrato de lêvedo após uma batelada simples inicial de 2 horas. O processo tem duração total de 24 horas, obtendo-se o volume final de 30,7 L. O cultivo é então centrifugado por 4 horas e logo após o sobrenadante é descartado e o rotor levado a um fluxo laminar para ser retirada a biomassa e a mesma ser colocada em uma bolsa estéril de 100 L aonde será adicionado 76,9 L de meio de produção e que será conectada ao biorreator de produção que tem duração de 6 h e 30 min, segundo o esquema da Figura 8.

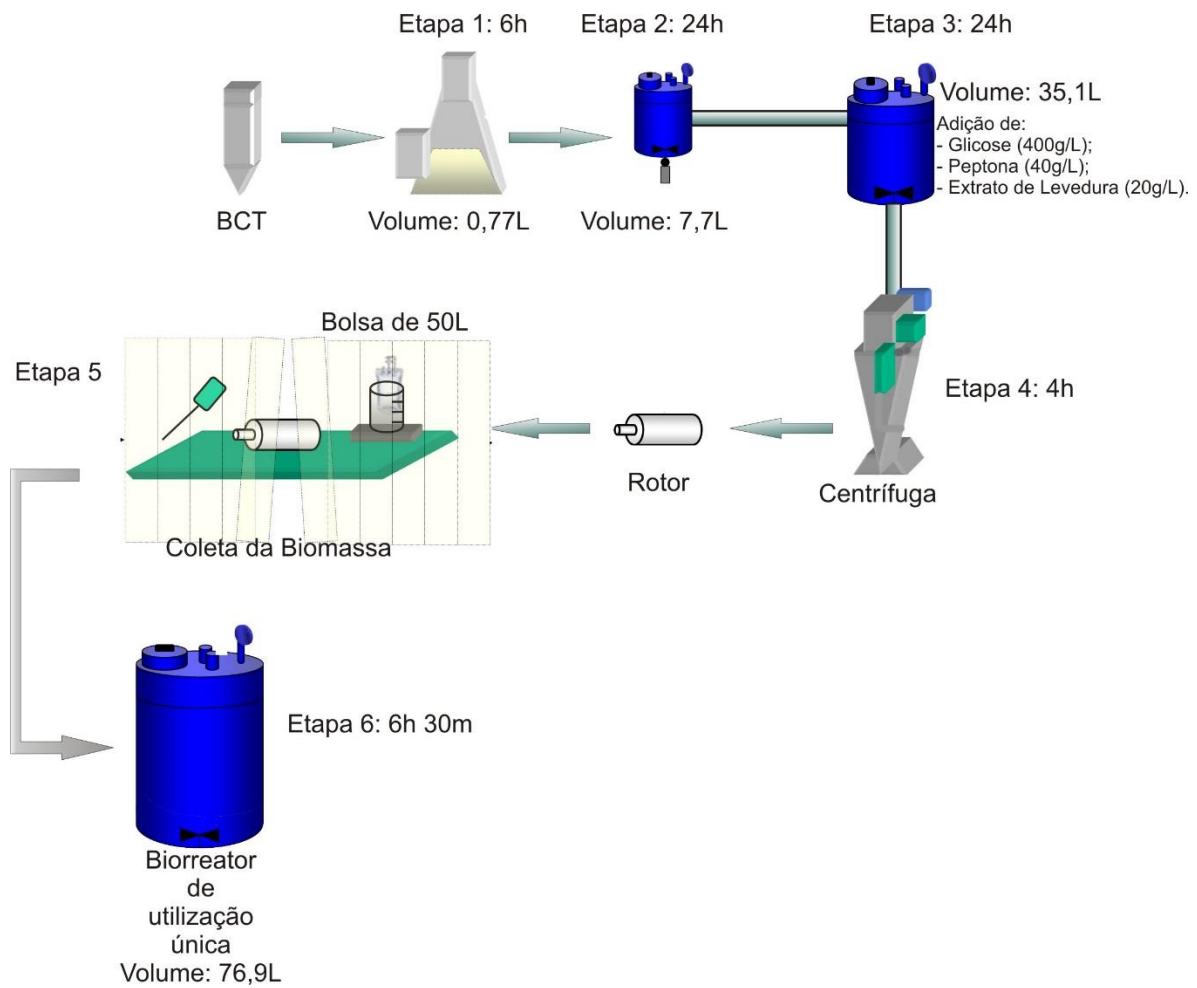


Figura 8 Esquema do processo de propagação das células para a produção do L-PAC considerando o cenário 2.

5.4.2 Diagrama de blocos com a proposta de produção do L-PAC

Com base nas discussões e nos cálculos descritos nos itens anteriores foi proposto um fluxograma do processo para cada cenário proposto, apresentados nas figuras 9 e 10.

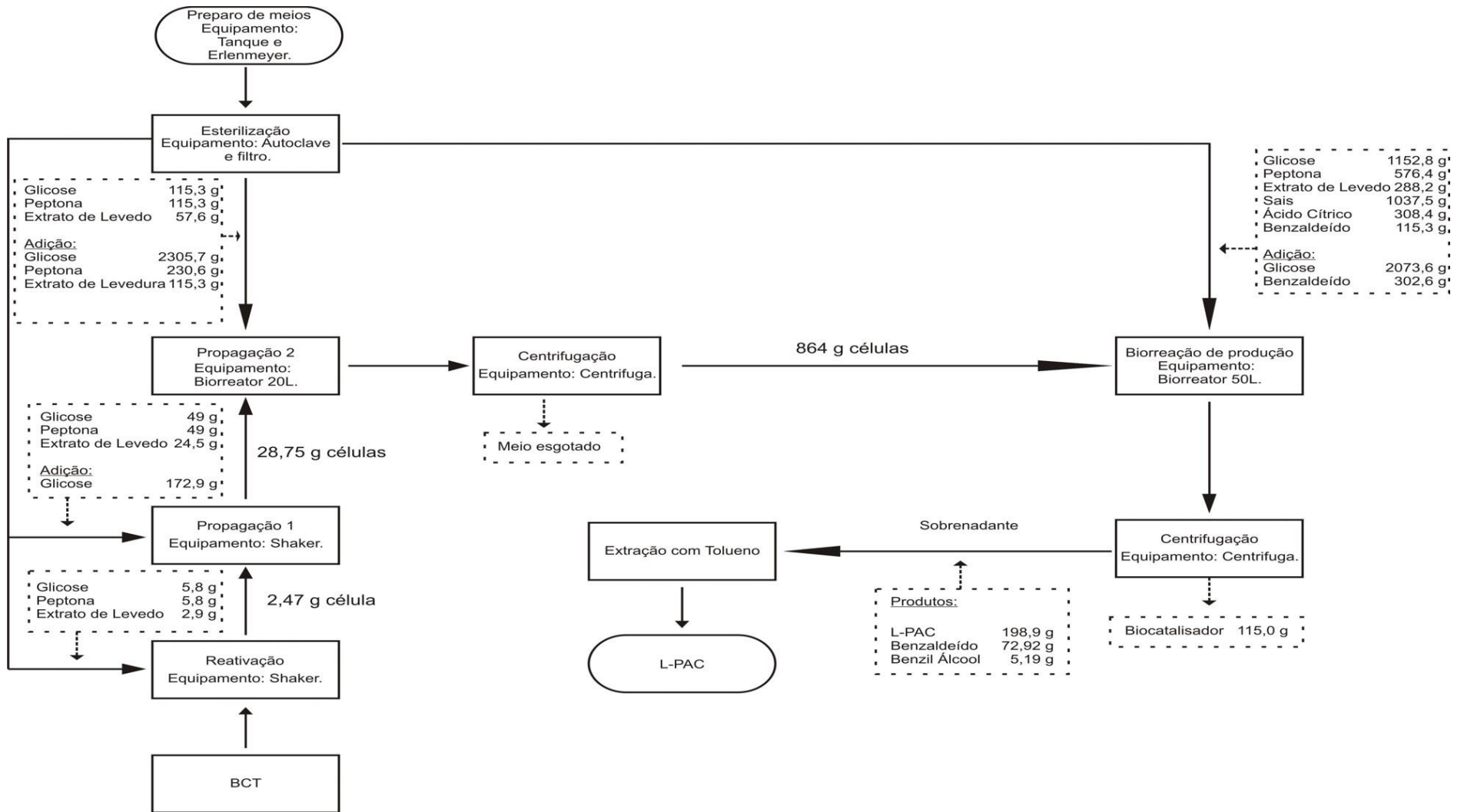


Figura 9 Diagrama de bloco cenário 1

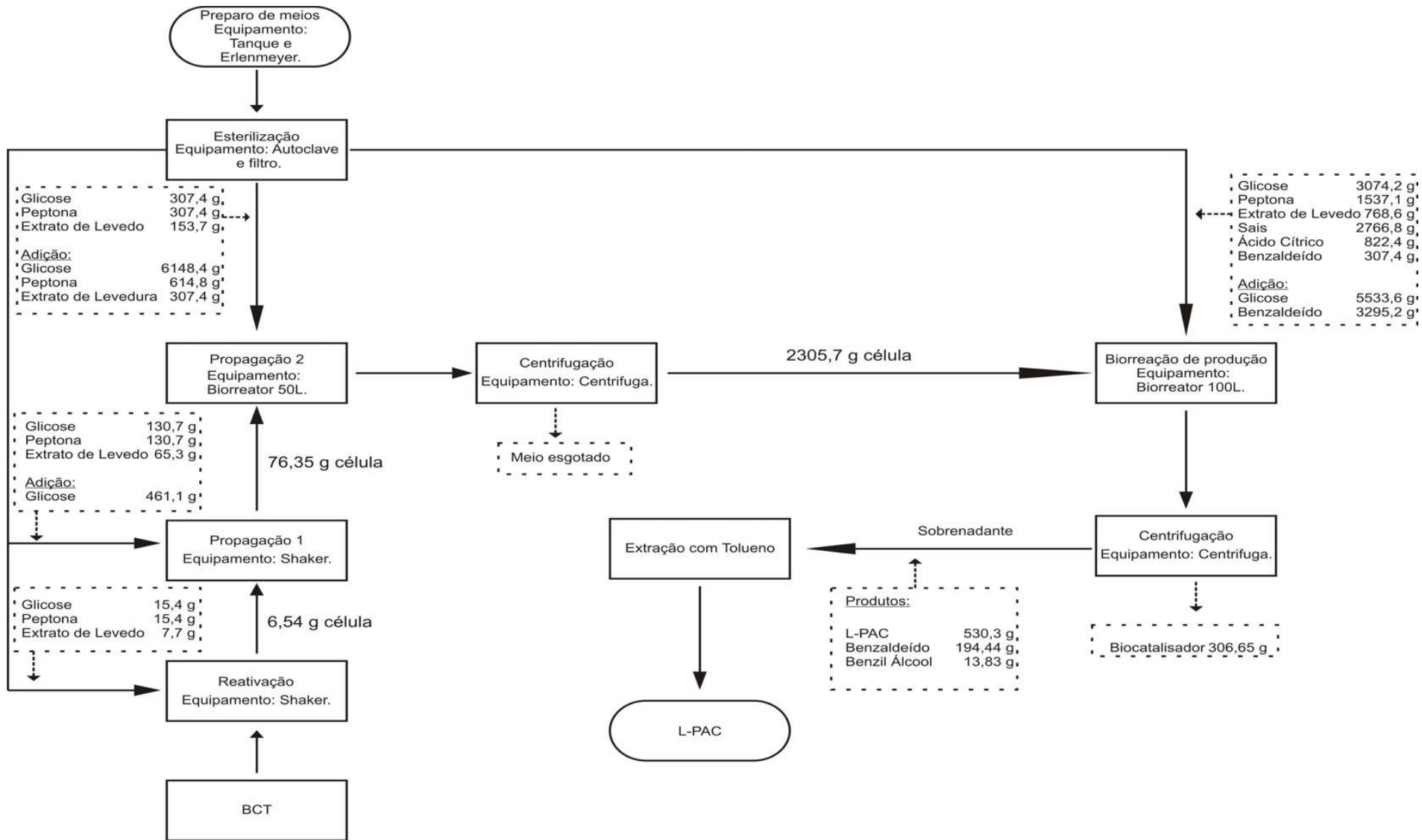


Figura 10 Diagrama de bloco cenário 2.

Considerando o diagrama de bloco da figura 9 (cenário 1) e a composição dos meios de cultivo e produção, bem como os volumes para cada etapa, é possível calcular os gastos com insumos do processo, para uma produção de L-PAC de 198,9 g (uma batelada).

- Glicose: 5.826,1g
- Extrato de Levedura: 498,5 g
- Peptona: 997,00 g
- Sais: 1037,5 g
- Ácido cítrico: 308,4g
- Benzaldeído: 417,9 g

Considerando o diagrama de bloco da figura 10 (cenário 2) é possível calcular os gastos com insumos do processo, para uma produção de L-PAC de 530,3 g. (uma batelada).

- Glicose: 15690,8 g
- Extrato de Levedura: 1312,7 g
- Peptona: 2625,4 g
- Sais: 2766,8 g
- Ácido cítrico: 822,4 g
- Benzaldeído: 3602,6 g

Os rendimentos dos dois cenários são iguais, pois partimos da premissa inicial de uma produção de 6,9 g/L de L-PAC a diferença de produção por batelada é devido ao aumento de escala no cenário 2.

6. Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- Para seguir as instruções de boas práticas de fabricação, relatadas na RDC 17, o reator mais adequado para o processo é o de utilização única pois são fornecidos pré-esterilizado para uso GMP. Assim sendo, não são necessários, no pré e pós uso, a execução de procedimentos de limpeza, além de diminuir o gasto da água e agentes químicos sanitizantes.
- As áreas de produção e de preparo de meios devem ser grau D devido a produção em estudo ser de um intermediário farmacêutico que ainda será posteriormente processado para gerar como produto final a efedrina.
- O controle em processo terá que ser realizado em um laboratório dentro da produção aonde serão realizadas as técnicas: cromatografia de fase reversa para a detecção do L-PAC e dos seus sub-produtos em HPLC, e análise de glicose durante o processo produtivo.
- Segundo a BPF o banco de cepas mãe terão que ser armazenados em no mínimo dois locais distintos na fábrica produtiva e o de trabalho terá que ser armazenado em no mínimo dois lugares distintos dentro da produção e que a melhor técnica de armazenamento de *Saccharomyces cerevisiae* por longo período segundo Suga *et al.* (2000) é a criopreservação utilizando sorbitol ao invés de glicerol.
- O cenário mais adequado para uma produção industrial é o segundo, pois oferece a opção de aumento de escala se o interesse futuro for tornar a planta em uma planta multipropósito.
- Com a escolha de um biorreator descartável a validação do processo diminui consideravelmente, pois para biorreator de produção não será necessário a realização da validação de limpeza antes de sua utilização em uma nova campanha.

7. Referência bibliográfica:

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. 2004 Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. v.02, n.2, p. 236-25.
- ABADIAS M, TEIXIDÓ N, USALL J, BENABARRE A, VIÑAS I. 2001 Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *J Food Prot.*; v.64, p.856-61.
- ANK, N. et al., 2006 Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infection in vivo. *Journal of Virology*, v. 80, n. 9, p. 4501-4509.
- ANTHEUNISSE J, DE BRUIN-TOL W, VAN DER POL-VAN SOEST ME. 1981 Survival of microorganisms after drying and storage. *Antonie van Leeuwenhoek.*; v.47, p. 539-45.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Disponível em: www.farmacia.ufg.br/uploads/130/original_RDC_17_de_2010.pdf. Acesso em 07 de março de 2014.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. Disponível em: <http://brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/106824-59.html>. Acesso em 07 de março de 2014.
- BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. 2000 Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247.
- Belter, P. A. 1985 *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., ed.; Pergamon Press: New York, v.2, p. 473-480.
- BILLIAU, A., 2006 Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 17, p. 381-409. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n.º 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza *ad referendum*, a publicação do guia para a realização de

estudos de estabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Seção 1, n. 146, p. 119, ago. 2005.

- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. , 2004 Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA.
- CARREIRA, A.C.O.; LEVIN G.; COELHO M.T.;BELCHIOR G.G.; SOGAYAR M.C.; 2013 Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção. Genética Escola, v.8 n.2
- CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J-M. 2007 Interferon-based therapy of hepatitis C. Advanced Drug Delivery Reviews, n. 59, p. 1222-1241.
- CINDRIC, M. et al., 2006 Evaluation of recombinant human interferon α -2b structure and stability by in gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40, p. 781-787.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. , 1991 Preservação de microrganismos: revisão. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268.
- COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. , 2009 Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122.
- DEMAÏN, A. L.; ELANDER, R. P.; 1999 *Antonie van Leeuwenhoek* , v. 75, p.5.
- DINIZ-MENDES L, BERNARDES E, DE ARAÚJO PS, PANEK AD, PASCHOALIN VMF. 1999 Preservation of frozen yeast cells by trehalose. Biothechnol Bioengin. v. 65(5), p.572-8.
- DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. , 2004 Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 3, p. 268-272.
- ELLAIAH, P. e KRISHNA, K.T. 1987 Studies on the production of phenyl acetyl carbinol from benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Drugs* v. 24, p. 192-195.

- ELLIS JJ, ROBERSON JA. 1968 Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. *Mycologia*;v. 60 p. 296-7.
- GENTLES JC, SCOTT E. 1979 The preservation of medically important fungi. *Sabouraudia* ;v.17, p. 415-8.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. 2004 Viabilidade de cepas de *Malasseziapachy dermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, v.37, n.3,p. 229-233.
- GOETZ, G.; IWAN, P.; HAUER, B.; BREUER, M.; POHL, M. 2001, *Biotechnol. Bioeng.*,v.74, p.317-325.
- GREEN, L. H. *Practical handbook of microbiology*. CRC: London, 2 ed. 2008.
- HERNANDEZ, J. R. et al. 1998 Estudio comparativo mediante diferentes soluciones para eluir el interferon alfa recombinante de una columna de inmunoafinidad. *Biotecnologia Aplicada*, v.15, n. 1, p.30-33.
- HINO A, MIHARA K, NAKASHIMA K, TAKANO H. 1990 Trehalose levels and survival ratio of freezetolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl Environ Microbiol.*; v.56(5) p. 1386-91.
- HIRASAWA R, YOKOIGAWA K, ISOBE Y, KAWAI H. 2001 Improving the freeze tolerance of bakers' yeast by loading with trehalose. *BiosciBiotechnolBiochem.*; v.65 (3) p. 522-6.
- KAWAMURA S, MURAKAMI Y, MIYAMOTO Y, KIMURA K.,1995 Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Freeze-drying of yeasts. Methods Mol Biol.* v. 38, p. 31-7.
- KAYSER, et al, 2005 *Medical Microbiology*. 2 ed. Stuttgart-New York: Thieme.
- KIESER, H. M.; BIBB, K. F.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A.; 2000 *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation: England.
- KIRSOP BE, SNELL JJS. 1984 *Maintenance of Microorganisms, A Manual of Laboratory Methods*. London: Academic Press Inc..
- KHAN T. R. e DAUGULIS A. J., 2011, The effects of polymer phase ratio and feeding strategy on solid–liquid TPPBs for the production of L-

- phenylacetylcarbinol from benzaldehyde using *Candida utilis*. *Biotechnology Letter*, v. 33, p. 63–70.
- KHAN, M. A.; JAVED, M. M. e QADEER, M. A. 2012. Studies on the production of L-phenyl acetyl carbinol by *Candida utilis* in shake flask. *Pak. J. Bot.*, v. 44, p. 361-364.
- LESLIE SB, ISRAELI E, LIGHTHART B, CROWE JH, CROWE L. 1995 Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Env Microbiol.*; v.61(10) p. 6592-7.
 - LONG, A. e WARD, O.P. 1989 Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of fermentation and toxicity effects of substrate and products. *Biotechnology and Bioengineering*, v.34, p. 933-941
 - MCGOWAN, S. J.; BYCROFT, B. W.; SALMOND, G. P. C., 1998 *Trends Microbiol.*, v.6, p.203
 - MIGUEZ, M.; NUNES PATRICIA; COELHO F.; PEDRAZA, S.; VASCONCELOS M.; CARVALHO O.; CELFO M.A. E AMARAL P. 2014 Application of Plackett–Burman Design for Medium Constituents Optimization for the Production of L-phenylacetylcarbinol (L-PAC) by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Transaction*, v.38. *in press*.
 - MIGUEZ, M. 2013 Síntese de L-Fenil-Acetil-Carbinol (L-PAC) por processo fermentativo, Proposta de tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
 - MIGUEZ, M., BOTELHO, P. N., AZEREDO, N., COELHO, M.A.Z., AMARAL, P. F. F. , 2012 Selection of yeasts for the production of L-phenyl acetyl carbinol. *Chemical Engineering Transactions*. , v.27, p.163 – 168
 - MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. 2000 Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. *Cryobiology*, New York, v. 4, n. 3, p. 251-255..
 - MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. , 2008 Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24.
 - NEUBERG, C. LIBERMANN, L. 1921. Zur kenntnis der carboligase: II. *Mitteilung. Biochemische Zeitschrift*, v. 121, p. 311-325.

- OLIVEIRA, A. A. C., SOUSA, T. V. S., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A. Z. EARAUJO, O.Q.F., 2010. Study of morphological and physiological parameters of cultures of *Yarrowia lipolytica* undergone electrochemical stress. *Chemical Engineering Transactions*, v.20, p.133-138.
- OKAFOR, N. 2007 The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. Science Publishers, p. 171-178.
- OPLUSTIL, C. P. 2004 *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier.
- PAOLI, DE P. 2005 Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS microbiology reviews*, Amsterdam, v. 29, p. 897- 910.
- Patrick G. L.; 2000 *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed., University Press: Oxford.
- QIANGQIANG Z, JIAJUN W, LI L. 1998 Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Mycoses*; v.41(5-6): p.255-7.
- QUIMICA NOVA INTERATIVA. Rio de Janeiro, 27 fev. 2014. Disponível em < <http://qnint.s bq.org.br> >. Acesso em: 27 fev. 2014.
- RAABO, E.; TERKILDSEN, T.C., 1960, On the enzymatic determination of blood glucose. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v.12, p. 402-407.
- RADHAKRISHNAN, R. et al., 1996 Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure*, v. 4, p. 1453-1463.
- REISDORFER, F.C. 2011 Estudo visando à extensão do prazo de validade da vacina febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, FIOCRUZ.
- RODRIGUES EG, LÍRIO VS. LACAZ CS. 1992 Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *RevInst Med Trop*. v. 34(2), p.159-65

- ROSCHE, B., SANDFORD, V., BREUER, M., HAUER, B., e ROGERS, P. 2001. Biotransformation of benzaldehyde into (R)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 309–315.
- ROSE D. 1970 Some Factors Influencing the survival of freeze dried yeast cultures. *J Appl Bact.*;v.33 p. 228-2.
- SARTORIUS. Rio de Janeiro, 27 fev. 2014. Disponível em <<http://www.sartorius.com/pt/produtos/bioreactores-fermentadores/utilizacao-unica/biostat-str/>>. Acesso em: 27 fev. 2014.
- SATO J. C. M. C dos. Fermentação descontínua. In: BORZANI et al. *Biotechnologia Industrial*, v:2. , 2001. cap. 9.
- SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R. 1999 Downstream processing of biotransformation broth for recovery and purification of L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC). *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 58, p. 591-593.
- SHUKLA, V.B. e KULKARNI, P.R. 2000. L -Phenylacetylcarbinol (L -PAC): biosynthesis and industrial applications. *World Journal of Microbiology eBiotechnology*, v. 16, p. 499-506.
- SHUKLA, V. B., MADYAR, V. R., KHADILKAR, B. M. e KULKARNI, P. R. 2002. Biotransformation of benzaldehyde to L-phenyl acetyl carbinol (L-PAC) by *Torulas poradel brueckii* and conversion to ephedrine by microwave radiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.77, p. 137-140.
- SILVA JR., J.G. 2004. Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático. *Interciência*, v. 01, p.111.
- SMITH, P.F. e HENDLIN, D. 1953. Mechanism of phenyl acetyl carbinol synthesis by yeast. *Journal of Bacteriology*, v. 65, p. 440-445.
- SOUZA, A. 2010 Interferon alfa 2b humano recombinante peguilado: estudo das propostas de obtenção da molécula e sua caracterização . Dissertação: (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)– Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química.
- SOUZU H. 1973 Proceedings: The phospholipid degradation and cellular death caused by freeze thawing or freeze-drying of yeast. *Cryobiology*; v.10(5): p.427-31

- SPENCER JF, SPENCER DM. 1996 Maintenance and culture of yeasts. *Methods Mol Biol.* v. 53 p.5-15.
- SUGA M, ISOBE M, HATAKEYAMA T. 2000 Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. *Yeast*; v.16, p.889-96
- TAKAGI H, IWAMOTO F, NAKAMORI S. 1997 Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *saccharomyces cerevisiae* from praline-analogue-resistant mutants. *Appl MicrobiolBiotechnol.*; v.;47, p. 405-11.
- THITINAN, S.; McCONVILLE, J., 2009 Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. *International Journal of Pharmaceuticis*, v. 369, p.121-135.
- VOET, J.P., VANDAMNE, E.J. e VLARICK, C. 1973. L-phenyl acetyl carbinol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschriftfu Èr Allgemeine Mikrobiologie*, v. 13, p. 355-365.
- ZHANG W., WANG, Z., ZHUANG, B., QI, H., 2008. Production of L-phenyl acetyl carbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Appl MicrobiolBiotechnol*,v. 78, p. 233–239