ADRIANO ALVES FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA REALIZAR A QUALIFICAÇÃO DE
PERFORMANCE DO BIORREATOR UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE TOXINA DIFTÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2013

ADRIANO ALVES FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA REALIZAR A QUALIFICAÇÃO DE
PERFORMANCE DO BIORREATOR UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE TOXINA DIFTÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Flávia Saldanha
Kubrusly

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ferreira, Adriano Alves.

Desenvolvimento da metodologia para realizar a qualificação de performance do biorreator utilizado para a produção de toxina diftérica / Adriano Alves Ferreira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Controle e validação de processos biotecnológicos.

Versão do título para o inglês: Development of the bioreactor performance qualification methodology to be use in the diphtheria toxin production.

1. Qualificação de performance 2. Biorreator 3. Toxina diftérica
I. Kubrusly, Profa. Dra. Flávia Saldanha II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0102/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Adriano Alves Ferreira.

Título da Dissertação: Desenvolvimento da metodologia para realizar a qualificação de performance do biorreator utilizado para a produção de toxina diftérica.

Orientador(a): Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

A minha mãe
e minhas irmãs Silvia e Débora
pela dedicação, confiança e pelo
apoio incansável para a minha
formação e pelo nascimento da minha
sobrinha Rafaela.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que eu realizasse este trabalho com muita saúde, paz e força para superar as dificuldades encontradas durante o curso.

À Dra. Sally Müller Affonso Prado pela concepção e orientação deste projeto, além da confiança em seu desenvolvimento.

À Dra. Flavia Saldanha Kubrusly pela confiança, dedicação e orientação.

À Maria Aparecida Sakauchi que sempre me orientou, incentivou e apoiou na minha trajetória no Instituto Butantan e permitiu a realização deste trabalho.

À Milena Apetito Akamatsu pela amizade, incentivo e colaboração para conclusão deste trabalho.

À Dra. Viviane Maiomani Gonçalves pelo esforço dedicado em corrigir e orientar neste trabalho acadêmico.

À todos os funcionários da Seção de Vacinas Aeróbicas que direta ou indiretamente colaborou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal da Garantia de Qualidade do Instituto Butantan que colaboraram com a realização de alguns testes neste trabalho.

À Fabia, Eliane e Marcos da secretaria de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo - USP, pelas constantes orientações burocráticas.

A todos do Serviço de Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas ICB-USP e em especial a Monica da Silva Amaral, pelas orientações na correção desta dissertação.

À todos os familiares e amigos que sempre me apoiaram nesta jornada.

RESUMO

FERREIRA, A. A. **Desenvolvimento da metodologia para realizar a qualificação de performance do biorreator utilizado para produção de toxina diftérica.** 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A Qualificação de Performance (QP) é um importante requisito das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e consiste de uma documentação completa de todas as atividades envolvidas para produzir um produto específico inclusive na sua forma intermediária, neste caso específico a toxina diftérica. O objetivo é garantir que todas as especificações do produto atendam aos resultados esperados das análises de rotina. Assim, o Instituto Butantan recentemente introduziu um biorreator para ser utilizado na produção da toxina diftérica e a QP foi considerada e desenvolvida. Para isto, análises da temperatura e pressão foram realizadas durante três ciclos de esterilização com uso de vapor puro. Além disso, sensores de temperatura e indicadores biológicos foram previamente distribuídos no equipamento considerando pontos críticos pré-observados dentro da dorna e em algumas outras partes que podem ou não ter contato com o produto (válvulas, conexões, filtros, etc.). Os resultados da curva de temperatura e pressão validaram o equipamento em termos desses parâmetros e destacaram a importância e distribuição dos sensores e indicadores biológicos. Além disso, três ciclos de crescimento de *C. diphtheriae* foram realizados e monitorados como estudo principal da QP. Um plano de amostragem foi realizado durante os ciclos de crescimento para ser representativo da produção analisando seu rendimento e pureza. Os resultados da densidade óptica (DO) ou turbidez, medidos durante o crescimento da biomassa tanto por um espectrofotômetro convencional como por um sensor de biomassa *on line*, mostraram títulos da toxina a partir de 48 até 64 horas como determinado pelo teste de floculação. Estes resultados foram consistentes e reprodutíveis e a toxina produzida foi então caracterizada bioquimicamente (o perfil eletroforético mostrou a banda esperada de 58 kDa). O Instituto Butantan após realizar a QP introduziu o biorreator na produção de rotina, uma vez que foi qualificado por sua funcionalidade como exigido pelas autoridades reguladoras (ANVISA, OMS).

Palavras-chave: Qualificação de performance. Biorreator. Toxina diftérica.

ABSTRACT

FERREIRA, A. A. **Development of the bioreactor performance qualification methodology to be use in the diphtheria toxin production.** 2013. 80 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Performance qualification (PQ) is an important requisite of the Good Manufacturing Practices (GMP). It consists on complete documentation of all activities involved to produce a specific product even if it is an intermediate form (this specific case, the diphtheria toxin). The goal is to ascertain all product specifications that were determined by its routine analysis. Thus, the PQ of the Instituto Butantan newly introduced bioreactor to be use in the diphtheria toxin production must be considered and developed. For that purpose the analysis of the temperature and the pressure monitored during three pure steam sterilization cycles was followed. Furthermore, temperature sensors and biological indicators where previously distributed in the equipment, considering critical pre-observed points inside the vessel and in other some parts that could enter in contact with the product (valves, ports, etc.). The temperature and pressure curve results validated the equipment in terms of these parameters and highlight the importance of the sensors and biological indicators distribution. In addition three *C. diphtheriae* growth cycles were performed and monitored as the main PQ study. A program of sample collection was done during the growth cycle to be representative of the toxin yield production and its purity. The optical density (OD) or turbidity results measured during the increase of the cell mass either by one conventional spectrophotometer and/or by one *on line* biomass sensor showed toxin titers after 48 till 64 hours of the harvesting as determined by flocculation test. The obtained growth curve results are consistent and reproducible and the produced toxin was characterized biochemically (the eletrophoretic profile showed the expected 58 kDa band). The Instituto Butantan after bioreactor PQ put the equipment in the routine production as it was qualified for its functional role as demanded by our regulatory authorities (ANVISA, WHO).

Keywords: Performance qualification. Bioreactor. Diphtheria toxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Domínios da molécula de toxina diftérica, revelados em análise cristalográfica....	32
Figura 2 - Distribuição dos sensores de temperatura e indicadores biológicos no interior do biorreator.....	39
Figura 3 - Sensores de temperatura e indicadores biológicos distribuídos nos filtros de entrada e saída do biorreator.....	39
Figura 4 - Sensores de temperatura e indicadores biológicos distribuídos nas linhas anexas do biorreator.....	40
Figura 5 - Distribuição dos sensores de temperatura e indicador biológico.....	40
Figura 6 - Biorreator <i>New Brunswick Scientific</i> - 500 L.....	44
Figura 7 - Bolsas plásticas estéreis para amostragem em sistema fechado e uso único.....	44
Figura 8 - Curvas de temperatura e pressão do 1º ciclo de esterilização no biorreator vazio.....	50
Figura 9 - Curvas de temperatura e pressão do 2º ciclo de esterilização no biorreator vazio.....	51
Figura 10 - Curvas de temperatura e pressão do 3º ciclo de esterilização no biorreator vazio.....	51
Figura 11 - Curvas de temperatura do 1º ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.....	53
Figura 12 - Curvas de temperatura do 2º ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.....	53
Figura 13 - Curvas de temperatura do 3º ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.....	54
Figura 14 - Curvas de temperatura e pressão do 1º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.....	55
Figura 15 - Curvas de temperatura e pressão do 2º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.....	55
Figura 16 - Curvas de temperatura e pressão do 3º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.....	56
Figura 17 - Correlação das curvas de biomassa DO _(530nm) e DO _(590nm) obtidas durante o 1º ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	59

Figura 18 - Correlação das curvas de biomassa DO _(530nm) e DO _(590nm) obtidas durante o 2° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	60
Figura 19 - Correlação das curvas de biomassa DO _(530nm) e DO _(590nm) obtidas durante o 3° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	60
Figura 20 - Curvas de biomassa DO _(590nm) e do sensor de biomassa <i>on line</i> obtidas durante os três ensaios de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	61
Figura 21 - Curvas de biomassa DO _(590nm) e produção de toxina diftérica, durante os três ensaios de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	63
Figura 22 - Correlação das curvas do sensor de biomassa <i>on line</i> e das leituras de DO _(590nm) durante o 1° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	65
Figura 23 - Correlação das curvas do sensor de biomassa <i>on line</i> e das leituras de DO _(590nm) durante o 2° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	65
Figura 24 - Correlação das curvas do sensor de biomassa <i>on line</i> e das leituras de DO _(590nm) durante o 3° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	66
Figura 25 - Velocidade específica (μ) durante o 1° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	67
Figura 26 - Velocidade específica (μ) durante o 2° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	67
Figura 27 - Velocidade específica (μ) durante o 3° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	68
Figura 28 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 1° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	69
Figura 29 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 2° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	69
Figura 30 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 3° ensaio de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>	70
Figura 31 - Eletroforese em Gel de Acrilamida (SDS-PAGE) com coloração <i>Cromassie Blue</i> 250 R das amostras referentes aos ensaios no biorreator.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de Difteria notificados no Brasil.....	25
Tabela 2 - Calendário vacinal do Ministério da Saúde, Estado de São Paulo, 2012.....	35
Tabela 3 - Critério de aceitação utilizado no estudo de temperatura e pressão durante os testes de esterilização do biorreator.....	41
Tabela 4 - Troca de parâmetros (<i>Set point</i>) das variáveis durante os ensaios de crescimento no biorreator.....	45
Tabela 5 - Resultados dos controles do meio de cultura preparado para os três ensaios de <i>C. diphtheriae</i> no biorreator.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF: Boas Práticas de Fabricação

C. diphtheriae: *Corynebacterium diphtheriae*

C. ulcerans: *Corynebacterium ulcerans*

C. tuberculosis: *Corynebacterium tuberculosis*

dT: Difteria e Tétano uso adulto

DT: Difteria e Tétano uso infantil

DTP: Difteria, Tétano e Pertussis

DTPa: Difteria, Tétano e Pertussis acelular

DtxR: *Diphtheria toxin regulator*

DTB: *Diphtheria toxin B*

EF 2: *Elongation factor 2*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

HB: Hepatite B

HB-EGF: *Heparin binding epidermal growth factor*

Hib: *Haemophilus influenzae b*

Kf: Tempo de floculação

IB: Instituto Butantan

IHM: Interface homem-máquina

ISP: Instituto de Saúde Pública

Lf: Limite de floculação

PLC: *Programmable Logic Controller*

QI: Qualificação de instalação

QO: Qualificação de operação

QP: Qualificação de performance

MS: Ministério da Saúde

NBS: *New Brunswick Scientific*

NIBSC: *National Institute for Biological Standards and Control*

PNI: Programa Nacional de Imunização

RBC: Rede Brasileira de Calibração

SCR: Sarampo, Caxumba e Rubéola

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

SIP: *Sterilization in place*

SP: *Set point*

SUS: Sistema Único de Saúde

UC: Unidade de concentração

VIP: Vacina Inativada de Poliomelite

VOP: Vacina Oral de Poliomelite

WHO: *World Health Organization*

μ: Velocidade específica de crescimento celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISAO DA LITERATURA.....	17
2.1 Produção de Anatoxina Diftérica.....	17
2.2 Qualificação do biorreator.....	19
2.2.1 Calibração.....	20
2.2.2 Qualificação de instalação.....	20
2.2.3Qualificação de operação.....	21
2.2.4 Qualificação de performance.....	22
2.3. Difteria.....	23
2.3.1 O <i>Corynebacterium diphtheriae</i>.....	25
2.3.2 Metabolismo.....	27
2.3.3 Toxina Diftérica.....	29
2.3.3.1 Determinação da concentração de toxina diftérica (Lf/mL).....	32
2.3.4 Tratamento e controle.....	33
2.3.5 Prevenção.....	34
3 OBJETIVO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Calibração, QI e QO.....	37
4.2 Sensores empregados nos testes de esterilização.....	37
4.2.1 Sensores de temperatura.....	37
4.2.2 Sensor de pressão.....	38
4.2.3 Indicadores biológicos.....	38
4.3 Testes de esterilização.....	38
4.4 Estudo de crescimento de <i>C. diphtheriae</i>.....	41
4.4.1 Microrganismo.....	41
4.4.2 Meio de cultura.....	41
4.4.3 Preparo do inóculo.....	42

4.4.4 Biorreator	42
4.4.5 Amostragem no biorreator	44
4.4.6 Ensaios no biorreator	45
4.5 Métodos analíticos	46
4.5.1 Determinação do Teor de Ferro	46
4.5.2 Avaliação de crescimento	46
4.5.3 Determinação do limite de floculação (Lf/mL)	47
4.5.4 Avaliação da pureza	47
4.5.5 Determinação da concentração de proteína	48
4.5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Butantan (IB) tem como missão desenvolver pesquisas e produtos que contribuam para o acesso a saúde, compartilhando conhecimento com a sociedade. Vinculado a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, é responsável por 51% de vacinas e 56% de soros para uso profilático e curativo do país (INSTITUTO BUTANTAN, 2013).

A instituição desenvolve produtos em escala piloto e produz imunobiológicos em escala industrial. As vacinas produzidas no IB são empregadas na prevenção de doenças como difteria, tétano, coqueluche, hepatite B, raiva e gripe. Os soros hiperimunes, todos para uso humano, de caráter curativo, abrangem os tipos antiofídicos, antitóxicos e antiviral, (CANTER; SILVA, 2000).

O IB é o único produtor nacional da anatoxina diftérica que é componente da vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis DTP, vacina dupla uso adulto difteria e tétano (dT), vacina dupla uso infantil difteria e tétano (DT) e a Tetravalente (DTP + *Haemophilus influenzae* tipo b). Segundo o calendário de imunização para difteria dentro do Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde (MS), as vacinas combinadas DTP + HiB ou DT são administradas inicialmente em quatro doses, no 2º, 4º e 6º mês e o reforço é dado no 15º mês (DTP ou DT). Os adultos recebem, a cada dez anos, as doses de reforço da vacina dupla para uso adulto (dT) (BRASIL, 2012).

No IB, a anatoxina diftérica é obtida a partir da toxina diftérica produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*, durante seu crescimento em biorreator sob parâmetros controlados de fermentação. Ao término do processo fermentativo, a toxina é separada da biomassa e tratada com formaldeído para eliminar sua toxicidade sem destruir sua imunogenicidade.

Objetivando fortalecer a capacidade nacional de produção desta vacina, o IB instalou-se um novo biorreator na rotina de produção da anatoxina diftérica e para isto, empreendeu-se uma série de esforços, para qualificar o referido equipamento conforme as “Boas Práticas de Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos”

estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005).

O atendimento as Boas Práticas de Fabricação (BPF) exige a validação dos processos produtivos e das atividades de suporte. Contudo, antes de iniciar os exercícios de validação, devem estar concluídos e documentados os processos de qualificação dos equipamentos críticos, dos sistemas e utilidades (BRASIL, 2005).

A qualificação de performance (QP) do biorreator, a qual requer os registros documentados de todas as atividades envolvidas, verifica que os equipamentos, sistemas e utilidades, quando operando em conjunto são capazes de executar com eficácia e reprodutibilidade os métodos e as especificações definidas no protocolo (BRASIL, 2005), neste caso específico, para produção de toxina diftérica.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias para realizar a QP do biorreator *New Brunswick Scientific* (NBS) com capacidade de 500L, de modo a assegurar a produção de toxina diftérica. Para desenvolver as metodologias pontos críticos do processo foram avaliados e foram realizados estudos de temperatura e pressão durante a esterilização do equipamento, bem como realizados três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae* de forma a assegurar que o produto obtenha qualidade, segurança e eficácia de acordo com uso pretendido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção da anatoxina diftérica

A metodologia estabelecida no IB baseia-se no sistema lote-semente e se inicia com a obtenção da toxina diftérica, através do processo fermentativo descontínuo do *C. diphtheriae* cepa Park-Williams nº 8, em biorreator contendo o meio N.Z.Amine[®] (Kerry Inc., Beloit, Wisconsin, EUA) (STAINER; CORKIL; SCHOLTE, 1968).

O meio de cultura é preparado a partir de hidrolizado de caseína, adição de Fe⁺⁺ (TCHORBANOV et al., 2004) e maltose como fonte de carbono (SAKAUCHI, 2003).

Parâmetros de fermentação, como: temperatura, agitação, fluxo de ar e pressão são controlados automaticamente, visando atingir ótimas condições de crescimento do *C. diphtheriae* e consequente produção da toxina diftérica.

Ao término do tempo estabelecido para o cultivo, a toxina diftérica é separada da biomassa através de sistema de filtração tangencial (SUNDARAN et al., 2002), concentrada em sistema de ultrafiltração molecular (30 kDa), seguida de filtração esterilizante em membranas de 0,22 µm.

Sundaran et al. (2002), apresentaram a metodologia de separação da toxina diftérica da biomassa microbiana por um sistema de filtração tangencial com controle de variáveis operacionais como: pressão transmembrana e taxa de fluxo que em ótimas condições, resultaram em >98% de recuperação da toxina produzida no biorreator.

Em 1923, Ramon observou que o tratamento da toxina diftérica com formol eliminou a toxicidade, sem destruir sua imunogenicidade e denominou o produto atóxico de anatoxina diftérica, a qual foi rapidamente indicada como vacina contra difteria, componente das vacinas combinadas em uso (HOLMES, 2000).

A destoxificação da toxina diftérica é feita pela ação do formaldeído e calor (TCHORBANOV; DIMITROV; VASSILEV, 2004). Após a destoxificação e a liberação da prova de toxicidade específica, os lotes são denominados anatoxina diftérica a granel.

O tratamento da toxina diftérica com formaldeído, envolve *cross-linkage* entre um grupo amino de lisina e um segundo grupo amino, que podem ser uma histidina e uma tirosina ou um triptofano ligados através de uma ponte estável de metileno (PAPPENHEIMER, 1984).

A anatoxina diftérica a granel é então concentrada de 5 a 10 vezes em um sistema de ultrafiltração molecular (30 kDa), diafiltrada usando solução salina tamponada pH 7,4, para remoção do formaldeído residual e então concentrada no mesmo sistema. Segue-se uma etapa de purificação por precipitação com sulfato de amônio e filtração esterilizante. Ao produto purificado adiciona-se timerosal (0,015 g%) como conservante.

Após a filtração esterilizante, a anatoxina diftérica purificada é amostrada pelo Serviço de Controle de Qualidade Interno para realização dos testes preconizados pela *World Health Organization* (WHO, 2005).

A anatoxina diftérica é um produto absolutamente estável, que embora destituído de toxicidade, conserva integralmente tanto sua capacidade imunogênica como a de combinar-se com a respectiva antitoxina, podendo desta forma, determinar sua concentração por floculação (Lf/mL). Entretanto, o poder imunogênico da anatoxina não tem correlação estrita com seu poder floculante, razão pela qual, nas provas finais de eficácia do produto é realizado o teste de potência, para avaliar a produção de antitoxina *in vivo* (BIER, 1975).

Os lotes de anatoxina aprovados são então destinados ao preparo das vacinas combinadas (DTP + HiB, DTP, DT e dT).

Na formulação final destas vacinas, utiliza-se no IB a concentração de 10 Lf/mL tanto para a anatoxina diftérica como para a anatoxina tetânica, com exceção da vacina dT, na qual a concentração da anatoxina diftérica é de 4 Lf/mL. Utiliza-se como diluente solução salina tamponada pH 6,4 e como adjuvante o gel de hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$. O timerosal na concentração de 0,008 g% é o conservante empregado.

O emprego de anatoxina diftérica em menor concentração na vacina dT, deve-se ao fato da sensibilização ao toxoide diftérico que ocorre nos adultos. Entre dois meses e cinco

anos de idade a ocorrência de alergia é relativamente rara. A partir dos sete anos, porém, essa situação se inverte, sendo bastante comum a reação alérgica, o que torna aconselhável o uso de toxoide diftérico mais diluído (DIAS DA SILVA, 1989).

O hidróxido de alumínio é rotineiramente aplicado para incrementar a imunogenicidade de antígenos. O grau de adsorção do hidróxido de alumínio com a anatoxina diftérica depende das suas propriedades físico-químicas, da presença de excipientes e pH da formulação de vacinas. O mecanismo de absorção é pela interação eletrostática, entretanto, pontes de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e interações de van der Waals exercem um importante papel na adsorção do antígeno ao adjuvante (REGNIER et al., 2012).

Os lotes de vacinas combinadas são submetidos aos testes microbiológicos, biológicos e físico-químicos.

2.2 Qualificação do biorreator

Para utilização do biorreator na produção de toxina diftérica, uma série de atividades foram realizadas visando atender as BPF evitando utilizar toxina diftérica como um produto não efetivo, de má qualidade e perigoso para saúde humana (MOHAMMED-ZIEGLER; MEDGYESI, 2011).

O cumprimento das BPF está orientado primeiramente a eliminação e diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados (BRASIL, 2010).

Daí a necessidade de desenvolver metodologias para calibração, qualificação de instalação (QI), qualificação de operação (QO) e a QP dos equipamentos empregados para a produção. No caso de um produto microbiano, o equipamento mais importante é sem dúvida o biorreator.

2.2.1 Calibração

Após aquisição de um biorreator, junto com as documentações referentes às especificações do equipamento e de sua funcionalidade, além de diagramas de instrumentação e tubulação, foram identificadas as partes e peças que necessitam ser calibradas e seus requisitos para o uso pretendido, de acordo com a utilização do equipamento para o processo.

Segundo a (BRASIL, 2005) durante os procedimentos de calibração devem ser utilizados padrões de referência certificados.

Os padrões de referência são rastreáveis na Rede Brasileira de Calibração (RBC) através de um plano de calibração com validade de um ano (CIANCIULLI; WATZIG, 2012).

2.2.2 Qualificação de instalação

De acordo com a (BRASIL, 2005) a qualificação de instalação consiste na avaliação da conformidade dos equipamentos, sistemas e utilidades, com o projeto aprovado, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Isto implica em assegurar que as instalações do referido biorreator, bem como do seu sistema computadorizado estão corretamente instalados de acordo com as especificações estabelecidas (BRASIL, 2010).

Sistemas de controle incluindo painel de comando e equipamentos (dorna do biorreator e linhas anexas) devem ser corretamente instalados de acordo com o plano de instalação e protocolos de qualificação de instalação, bem como requerimentos de calibração, manutenção e limpezas, devem ser desenvolvidas durante as instalações (WHO, 2005).

Através de documentos, deve ser evidenciado que a instalação está de acordo com os requisitos do usuário e as especificações de projeto, recomendações do fabricante e BPF, definindo a metodologia para a execução de testes, estabelecendo os critérios de aceitação e

correção dos eventuais desvios encontrados durante esta etapa (WHO, 2005).

Segundo Agnihotri et al. (2013), a QI é uma das fases de validação de um processo, que reduz os riscos envolvidos em uma rotina de produção e deve garantir uma boa manutenção das partes e peças de um equipamento.

2.2.3 Qualificação de operação

A qualificação de operação (QO) é evidenciada através de documentos que comprovem que utilidades, sistemas, equipamentos e todos os seus componentes operam de acordo com as especificações operacionais. Consegue-se isto, testando-se os controles de operação, como alarmes, interruptores e painéis de comando, que devem demonstrar operações satisfatórias nas faixas normais de operação (BRASIL, 2010), e nos limites de suas condições operacionais incluindo-se as condições de pior caso – o desafio (THIBAudeau et al., 2011).

A QO inicia-se após eventuais modificações e/ou reparos dos instrumentos e abrange um número de testes funcionais suficientes para verificar que as operações dos instrumentos, atendam as especificações da produção, com o uso de parâmetros aprovados (KAMINSKI et al., 2010).

A QO permite verificar o desempenho aceitável dos instrumentos, em intervalos regulares durante a rotina de produção, bem como a frequência destes testes, dependerá da confiança dos instrumentos e da criticidade dos mesmos (CIANCIULLI; WATZIG, 2012).

Desta forma, o conjunto de operações que estabelece que equipamentos, sistemas e utilidades, apresentam desempenho conforme previsto em todas as faixas operacionais consideradas importantes para o processo (BRASIL, 2005), é o exercício fundamental para o estudo das variáveis críticas (parâmetros) que definirão as operações e funcionalidade deste novo biorreator.

2.2.4 Qualificação de performance

A qualificação de performance (QP), é o estabelecimento e fornecimento de evidências documentadas, de que um processo específico produzirá consistentemente um produto que atenda suas especificações e atributos de qualidade (BRASIL, 2010).

A QP de um biorreator deve fornecer informações documentadas de que o processo de produção é eficiente, que os equipamentos, procedimentos e operadores envolvidos no processo são capazes de realizá-lo, de acordo com os critérios de aceitação, de modo reprodutível (FDA, 2011).

Segundo Lübbert e Jorgensen (2001), a QP de um biorreator é um conceito chave para indústria. Um dos requerimentos comuns na indústria, é a reprodutibilidade para se obter os resultados mais próximos possíveis do estabelecido nos procedimentos operacionais.

Para um processo biológico que inclui microrganismos, estudos de crescimento de células e expressão de produtos, como no caso da toxina diftérica, é necessária uma construção adequada do biorreator, para fornecer um ambiente necessário às reações biológicas (ZHONG, 2011).

De acordo com o ponto de vista do guia FDA 2011, entende-se que a QP, é descrita de acordo com o entendimento do processo, através da coleção de dados, que estabelece evidência científica e tecnológica que o processo é capaz de produzir consistentemente um produto de qualidade.

Desta forma, a proposta deste trabalho é apresentar os trabalhos de calibração, QI, QO, porém com particular interesse em descever a metodologia aplicada durante a qualificação de performance deste biorreator, através dos testes de esterilização e de crescimento de *C. diphtheriae*, permitindo assim, o uso deste equipamento na rotina de produção do IB, atingindo aos padrões de qualidade do produto dentro das BPF.

Alcançar e manter a esterilidade de produtos é uma preocupação constante das indústrias farmacêuticas. Um das formas abordadas é assegurar o uso de filtros

previamente esterilizados por calor (CHISTI, 2005).

Berovick (2005) descreveu que o uso de esterilização por calor, aplicados a equipamentos em escala industrial, representa uma das mais importantes etapas para manter condições assépticas, durante um processo biológico.

Biorreatores bem desenhados, com sistema de esterilização automático e sistema de selagem da agitação (barreira contra contaminantes), com uso de vapor, são essenciais para obter a esterilidade de uma cultura pura (JUNKER et al., 2006).

O uso de vapor saturado em biorreatores industriais é vantajoso com relação a outros fluidos quentes, que podem comprometer o sucesso de uma fermentação. A utilização de esterilização por vapor saturado *in situ*, é destinada a biorreatores e tubulações anexas (LUI, 2013).

Importante ter em mente, que o grau de controle sobre os atributos ou parâmetros, deve ser proporcional ao risco deles para o processo (MOHAMMED-ZIEGLER; MEDGYESI, 2011).

A QP é um exercício que atualmente vem sendo feito de forma mais efetiva e regular para equipamentos que serão utilizados em rotinas de produção (KAMINSKI et al., 2010).

2.3 Difteria

A difteria é uma doença bacteriana aguda que ataca as amídalas, faringe, laringe, nariz e algumas vezes outras mucosas ou a pele, causada pela toxina diftérica produzida pelo bacilo *C. diphtheriae* (BISSUMBHAR et al., 2004), e contribui para a formação de pseudomembrana na região nasofaríngea de indivíduos infectados (WAGNER et al., 2010).

A colonização destes organismos é raramente encontrada fora do local da área da infecção, mas a toxina é absorvida no sistema circulatório e assim disseminada no organismo humano, causando complicações sistêmicas como miocardite e neurite (WAGNER et al., 2010).

Além das placas na garganta, a toxina diftérica também causa febre baixa (entre 37,5 e 38 °C), abatimento, palidez e dor de garganta discreta. Se não for devidamente tratada, a difteria evolui causando inchaço no pescoço (nos gânglios e nas cadeias cervicais) (BISSUMBHAR et al., 2004).

A cobertura da traquéia pela pseudomembrana pode reduzir o fluxo de ar e eventualmente resultar em um completo bloqueio, causando sufocação e morte (MOKROUSOV, 2009).

Ocorre também infecção cutânea por *C. diphtheriae* (difteria cutânea). Esta é adquirida por contato cutâneo com outras pessoas infectadas. O microrganismo coloniza a pele até a formação de úlcera crônica que não cicatriza e algumas vezes ficam recobertas por uma membrana acinzentada onde podem ocorrer sinais sistêmicos da doença, devido aos efeitos da exotoxina (MURPHY, 2000).

Três espécies de *C. diphtheriae* produtoras de toxina foram identificadas: *C. diphtheriae* que é normalmente associada com doenças transmissíveis em humanos e *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, ambas pouco comuns em humanos e tradicionalmente associadas com contato de humanos com animais de fazenda ou produtos lácteos (WAGNER et al., 2010).

Romme et al. (2006), revelaram formas não-tóxicas de cepas de *C. diphtheriae* em pacientes com bacteremia, bem como foram o primeiro grupo a reportar uma emergente infecção invasiva no sangue causada por *C. diphtheriae* não-tóxica na América do Norte.

A difteria é uma doença bastante controlada no Brasil e em diversos países desenvolvidos, graças à ampla cobertura vacinal, entretanto, casos de difteria foram reportados após a grande onda epidêmica em Latvia, Rússia e Ucrânia. A difteria é ainda endêmica em diversas partes do mundo, particularmente na Ásia (Índia, Indonésia, Irã, Nepal, Paquistão, entre outros) e África (Gana) (MANCINI et al., 2012).

Casos de doença invasiva por cepas não toxigênicas de *C. diphtheriae*, foram descritas em usuários de drogas injetáveis na Holanda, em índios na Austrália, alcoólatras moradores de rua na França e em pacientes com infecções na Alemanha. Um aumento

semelhante de cepas não-toxigênicas isoladas no Reino Unido foi observado (ROMMEY et al., 2006).

Em 1890, Von Behring e Kitasato demonstraram que animais susceptíveis, podem ser imunizados por injeção com doses graduadas do bacilo diftérico e o soro de cada animal imunizado, protegeu outros animais susceptíveis dos efeitos tóxicos da toxina diftérica. Em 1891, a antitoxina diftérica preparada em experimentos animais, foi utilizada com sucesso no tratamento de difteria em crianças (HOLMES, 2000).

Em 1901, Von Behring recebeu o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina, em razão de sua notável contribuição no desenvolvimento de soro antidiftérico utilizado como terapia para pacientes com difteria.

O número de casos de difteria notificados no Brasil vem decrescendo progressivamente, em decorrência do aumento da utilização da vacina DTP, conforme se observa na tabela 1.

Tabela 1 - Casos de difteria notificados no Brasil.

Ano	Número de casos	Coeficiente de incidência /100 mil habitantes	Observação
1980	4646	3,9	
1990	640	0,44	
2000	58	0,03	
2004 a 2009	30	~ 0,03	
2010	33	--	Surto de difteria no Maranhão
2011	05	0,003	

Fonte: Brasil, 2012.

2.3.1 O *Corynebacterium diphtheriae*

Descrito por Klebs em 1883 e isolado em cultura pura por Loeffler em 1884, o *C. diphtheriae*, apresenta-se em formas de bastonetes imóveis, de 1 µm a 6 µm de

comprimento por 0,3 µm a 0,8 µm de largura, não possui cápsula ou esporo e é Gram-positivo. O corpo bacteriano é reto ou ligeiramente encurvado, de extremidades arredondadas ou intumescido, com acentuada tendência ao pleomorfismo – formas em clava, em pêra, em fuso ou haltere.

O genoma do *C. diphtheriae*, consiste de um cromossomo circular único com 2.488.635 pb, não possui plasmídeo e apresenta em sua composição, um conteúdo visivelmente alto de G + C perto da origem terminal de replicação (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003).

O *C. diphtheriae* é modelo clássico de virulência bacteriana. A toxicidade observada na difteria é diretamente atribuída a uma exotoxina secretada pela bactéria no foco de infecção. Os microrganismos não necessariamente passam para a corrente sanguínea para produzir os sinais sistêmicos da doença (MURRAY, 2000).

Infecções humanas por *Coryneform sp* não somente estão aumentando, mas microbiologistas estão mais atentos as possíveis importâncias deles, principalmente em pacientes de alto risco e imunodeprimidos. Mais de duas décadas passadas outras espécies de *Corynebacterium*, diferente de *Corynebacterium diphtheriae* já tinham sido encontradas em pessoas com infecções severas. Bacteremia, endocardia, infecções de urina e trato respiratório, foram as mais comuns infecções associadas com *Corynebacterium sp* (SOTO; ZAPARDIEL; SORIANO, 1994).

Estudos recentes mostraram que os três biótipos, podem produzir a exotoxina diftérica letal, exceto um quarto biótipo denominado *belfanti* que não a produz (MOKROUSOV, 2009).

A cepa Park Willians 8 de *C. diphtheriae*, isolada por Park e Willians in 1896, produz consistentemente grande quantidade de toxina diftérica, e por isto é utilizada mundialmente nos processos de obtenção de toxina diftérica direcionados à produção de vacinas (HOLMES, 2000).

2.3.2 Metabolismo

O ferro é um sinal do ambiente e regula a expressão coordenada dos genes associados com a virulência de muitas bactérias patogênicas, entre elas, o *C. diphtheriae*, sendo essencial para o crescimento desta bactéria (TAI et al., 1990).

A produção de toxina diftérica é controlada pela concentração de ferro no meio em que se encontra o *C. diphtheriae*, pois o ferro, dependendo da sua quantidade, inibe a liberação de toxina diftérica no meio de cultura, tornando nessas condições um processo inviável (DAVIS, 1990).

A produção de toxina diftérica é induzida quando a bactéria está em crescimento sob concentrações baixas e ausência de ferro no meio de cultura (TAI et al., 1990).

Dependendo da composição do meio de cultura e condições de cultivo, a produção de toxina diftérica pode ser dramaticamente afetada. Um dos principais efeitos é entender o papel do ferro na toxigenese de *C. diphtheriae* (HOLMES, 2000).

A toxina codificada pelo bacteriófago é o principal fator de virulência do *C. diphtheriae*, contudo, a análise da primeira sequencia do genoma completo de *C. diphtheriae*, revelou outros fatores de patogenicidade incluindo sistema de absorção de ferro e proteínas adesinas e fimbriais (MOKROUSOV, 2009).

O procedimento tradicional de cultura estacionária é o mais simples para o crescimento de *C. diphtheriae*, porém, exige trabalho intenso, requer espaço considerável e apresenta alto risco de comprometimento do produto, do ponto de vista de obtenção de cultura pura, além de geralmente apresentar baixo rendimento em produção de toxina, como já foi observado em lotes consecutivos de produção. Mais ainda, este tipo de cultura é difícil para escalar e, portanto, não é viável economicamente (SUNDARAN; RAO; BOOPATHY, 2001). Estes problemas foram superados quando da implantação da metodologia de cultura em biorreatores.

Sundaran, Rao e Boopathy (2001) utilizaram digesto enzimático de carne e maltose. Esta última como fonte de carbono visando à máxima produção de toxina diftérica no

biorreator. Também controlaram a concentração de ferro na composição final do meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano e desta forma, obtiveram altos rendimentos na produção de toxina.

Diferentes meios de cultura contendo hidrolizado de gelatina, digesto ácido de caseína e digesto enzimático de carne, são considerados favoráveis à produção de toxina diftérica. Assim, cultivos em meios contendo o digesto enzimático de carne, apresentam altos títulos de toxina diftérica (SUNDARAN; RAO; BOOPATHY, 2001).

Entretanto, estes componentes são ricos em proteína animal e contém substâncias que são oriundas da corrente sanguínea e que se ligam às moléculas de toxina diftérica, formando um polímero que mesmo após etapas subsequentes de purificação, dificultam a sua remoção, resultando em 60 a 70% de pureza do produto (TCHORBANOV; DIMITROV; VASSILEV, 2004).

Outro fator a considerar, é a possível reação alérgica local e sistêmica quando se administram vacinas combinadas contendo estas substâncias de origem animal (MOKROUSOV, 2009) bem como a dificuldade em padronizar os componentes do meio de cultura e otimizar o crescimento de *C. diphtheriae* atendendo as recomendações da WHO (TCHORBANOV; DIMITROV; VASSILEV, 2004).

A WHO recomenda a utilização de meios de cultura semi-sintéticos para crescimento de *C. diphtheriae*. Estes apresentam importantes vantagens, como por exemplo, a investigação científica sobre o metabolismo desta bactéria que propiciam importantes conhecimentos acerca dos fatores que afetam a produção de toxina durante os cultivos de *C. diphtheriae*, tais como: o pH, a concentração de hidrolizado de caseína e ferro no meio de cultura (TCHORBANOV; DIMITROV; VASSILEV, 2004).

Com o intuito de eliminar o uso de meios de cultura à base de carne e as consequentes reações em humanos, pesquisas tem sido desenvolvidas, visando a produção de novos meios de cultura semi-sintéticos para uso na produção de vacinas aplicáveis em humanos (MOKROUSOV, 2009).

Estudos recentes empregando meios semi-sintéticos na produção da vacina DTP,

demonstraram alta imunogenicidade, além de uma significativa diminuição na incidência dos eventos adversos locais (reações), quando comparados com a vacina produzida com meio de cultura contendo derivados de origem animal (SHARMA et al., 2012).

O meio de cultura destinado ao crescimento do *C. diphtheriae*, necessita de glicose como fonte de energia, porém em concentrações limitantes de crescimento, pois a glicose é rapidamente convertida em ácidos carboxílicos e etanol, ocasionando queda do pH do cultivo, onde nestas condições, cessa o crescimento bacteriano e não há produção de toxina diftérica (SAKAUCHI, 2003).

De acordo com a equação (1), utiliza-se a maltose como fonte de energia, uma vez que a formação de ácidos é mais lenta devido à dissociação deste dissacarídeo em glicose. Quando toda glicose for consumida pelo *C. diphtheriae*, o pH aumenta novamente.

O acúmulo de ácidos carboxílicos depende do fornecimento da glicose e da rapidez com que os ácidos carboxílicos são oxidados. Esta última etapa é dependente da disponibilidade de oxigênio livre, obtida com uma adequada aeração do cultivo (SAKAUCHI, 2003).

A toxina diftérica é sintetizada por cepas toxigênicas de *C. diphtheriae*, na forma precursora com clivagem da sequência sinal do aminoácido 25, com conseqüente liberação no meio de cultura como uma proteína de cadeia única contendo 535 aminoácidos (MURPHY, 2011).

2.3.3 Toxina Diftérica

Em 1888, Roux e Yersin demonstraram que filtrados de culturas de *C. diphtheriae*, continham uma potente proteína tóxica termolábil chamada toxina diftérica.

Apesar da freqüente ocorrência de cepas não toxigênicas de *C. diphtheriae*, sua

posição taxonômica permaneceu obscura, até que Freeman verificou a conversão de uma cepa lisogênica para toxigênica utilizando o fago $\beta^{\text{tox}+}$ (FREEMAN, 1951).

O gene estrutural (*tox*) está presente em certos corynefagos, incluindo o muito estudado fago $\beta^{\text{tox}+}$. A transcrição do gen (*tox*) é rapidamente inibida em *C. diphtheriae* pela adição de ferro no meio de crescimento (TAI et al., 1990).

Na presença de altas concentrações de ferro, o gene *tox* encontra-se reprimido por uma proteína reguladora conhecida como DtxR (*diphtheria toxin regulator*), ou seja, o ferro atua como um co-repressor (HOLMES, 2000).

Uchida et al. (1971), utilizaram uma cepa “mitis” não-toxigênica típica conhecida como C7 (-) $^{\text{tox}-}$ e um filtrado lisado de uma cepa toxigênica para efeito de conversão. Freeman, 1951 demonstrou que o fago β carrega o gene *tox* que é essencial para a produção de toxina apresentada pela bactéria e que o *tox* codifica o gene estrutural para toxina.

A toxina diftérica é um tipo de proteína tóxica que contem dois fragmentos, denominados A e B. O fragmento B se liga aos receptores da superfície das células dos hospedeiros (NASCIMENTO et al., 2010).

O fragmento A é responsável pela toxicidade, interferindo enzimaticamente com a síntese protéica da célula hospedeira e consequente morte da célula por apoptose (MURPHY, 2011).

Embora haja uma variedade de antígenos para ambos os fragmentos, os anticorpos dirigidos contra o fragmento B são aqueles que protegem contra a infecção, pois impedem a ligação da toxina diftérica ao receptor celular, neutralizando sua ação (TRABULSI, 2004).

A expressão do fragmento B recombinante da toxina diftérica em outros organismos procariotos, além de *C. diphtheriae*, é uma alternativa necessária para o entendimento do papel da toxina diftérica no desenvolvimento e severidade dos processos infecciosos toxêmicos (NASCIMENTO et al., 2010).

A formação da toxina diftérica ocorre em duas etapas: ao sair do citoplasma e atravessar a membrana citoplasmática, onde seu peptídeo sinal é removido e a toxina é então secretada como uma cadeia polipeptídica única, que é clivada por uma protease,

dando origem a dois fragmentos denominados A e B que permanecem unidos por uma ponte dissulfeto (MURPHY, 2011).

O peso molecular da molécula da toxina diftérica é de aproximadamente 58 kDa (PAPPENHEIMER, 1984). O fragmento A tem peso molecular de 21 kDa, é estável e não-coagulável pelo calor. O fragmento B tem peso molecular de 37 kDa e é instável em condições naturais (MURPHY, 2000).

A molécula protéica intacta é enzimaticamente inativa, assim como os fragmentos A e B, separadamente, não são tóxicos, mas *in vitro* o fragmento A é ativo (MURPHY, 2000).

O mecanismo de ação da toxina em células suscetíveis envolve: ligação do fragmento B aos receptores específicos da membrana citoplasmática, penetração do fragmento A no citoplasma e inibição da síntese protéica (MURPHY, 2000).

O receptor *heparin binding epidermal growth factor* (HB-EGF) da toxina, é o fator de crescimento epidérmico de ligação da heparina, presente na superfície de muitas células eucarióticas, particularmente células cardíacas e nervosas. Esta localização explica os sintomas cardíacos e neurológicos observados em pacientes com difteria grave (COLLIER, 2001).

Este receptor é muito importante na sinalização celular e está presente em muitos tipos de células, mas sua concentração é variável. As células com maior concentração de HB-EGF são as mais sensíveis à toxina (COLLIER, 2001).

Após fixação da toxina à célula do hospedeiro, ela é ingerida numa vesícula endocítica e o fragmento A é liberado no citoplasma da célula do hospedeiro – um evento mediado pela região de translocação do fragmento B. A seguir, a subunidade A catalisa a ADP-ribosilação do fator de alongação 2 (EF-2) (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003).

O EF-2 é necessário para o movimento das cadeias de peptídeos nascentes nos ribossomas e sua renovação é muito lenta. Foi estimado que uma molécula de toxina diftérica tenha capacidade de inativar todo o conteúdo de EF-2 na célula, interrompendo por completo a síntese de proteínas da célula hospedeira com conseqüente morte celular (COLLIER, 2001).

A toxina diftérica é extremamente potente. A sua dose letal para humanos e animais susceptíveis é estimada em 0,1 µg/Kg de peso corporal e uma única molécula do fragmento A é suficiente para matar uma célula do hospedeiro (HOLMES, 2000).

Estudos bioquímicos, genéticos e cristalográficos mostraram que a toxina diftérica é composta de três domínios estruturais e funcionais, a saber: domínio N-terminal catalítico (ADP-Ribosi transferase); domínio transmembrânico, que facilita a translocação do domínio catalítico para o citosol da célula hospedeira e domínio fixador da toxina ao receptor celular (figura 1). O fragmento A da molécula encerra o domínio catalítico e o B, os domínios transmembrânicos e fixador da molécula ao receptor celular (MURPHY, 2000).

Figura 1 - Domínios da molécula da toxina diftérica, revelados em análise cristalográfica.

Fonte: Murphy, 2000.

2.3.3.1 Determinação da concentração de toxina diftérica (Lf/mL)

O teste de floculação é realizado pela técnica de Ramon, em que o valor de floculação da toxina diftérica, é determinado pelo número de unidades de anticorpos (antitoxina) que quando misturadas as amostras de toxinas, a uma temperatura controlada de incubação de 45 °C em banho-maria promove uma mistura com floculação visível, como

resultado da formação de um complexo antígeno-anticorpo (RAMON, 1956).

Esta técnica é utilizada como controle de processo de produção de toxina diftérica, durante o processo fermentativo de *C. diphtheriae*, onde o título desta toxina é expresso em limite de floculação por mililitros (Lf/mL).

O primeiro reagente de referência internacional da anatoxina e toxina diftérica para o teste de floculação foi estabelecido em 1988 (PRENETA-BLANC et al., 2008).

Estes reagentes são essenciais para a padronização das análises utilizadas para calcular as unidades de limite de floculação (Lf) em toxinas. A substituição dos padrões internacionais foi realizada com amostras fornecidas por fábricas produtoras de vacinas na Europa, com instruções para uso e estocagem dos padrões. O resultado deste estudo foi apresentado para análise no *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) (PRENETA-BLANC et al., 2008).

Embora países desenvolvidos ainda utilizem a técnica de Ramon como controle de produto em processo e produto final, novas técnicas através de dispersão de luz a laser foram testadas para detecção da formação de complexos antígeno-anticorpo e os resultados mostraram ser altamente reproduzíveis e suficientes para determinação estatística dos valores de toxina/anatoxina em Lf (IWAKI et al., 2007).

2.3.4 Tratamento e controle

O tratamento da difteria tem dois objetivos principais: neutralizar a toxina e erradicar a bactéria do foco de infecção. O primeiro objetivo é atingido pelo emprego de soro antidiftérico obtido através da hiperimunização de equinos e o segundo pelo emprego de antibióticos (MURPHY, 2000).

O aspecto mais importante do tratamento da difteria consiste na administração precoce com soro antidiftérico, uma preparação de imunoglobulina que neutraliza especificamente a toxina diftérica, antes de sua ligação com a célula hospedeira (WAGNER et al., 2010).

Relatos atuais destacam que países desenvolvidos estão sem estoque de soro antidiftérico, isto devido à baixa prevalência do risco de difteria e/ou dificuldades no fornecimento de soro (WAGNER et al., 2010).

No intuito de atender situações emergenciais, foram selecionados pacientes convalescentes de difteria para servir como fonte doadora de imunoglobulinas anti-difteria. O critério para seleção dos pacientes foi apresentar título de anti-toxina $>3,0$ UI/mL (BISSUMBHAR et al., 2004).

2.3.5 Prevenção

A medida de controle mais segura e efetiva contra a difteria é a imunização adequada da população com a vacina. A infecção pode ser adquirida tanto em pessoas com imunização inadequada como em pessoas que não receberam nenhuma dose da vacina.

As vacinas DTP e DT usadas no Brasil contêm 10 Lf/dose de anatoxina diftérica e a dT 2 Lf/dose.

O Sistema Único de Saúde (SUS) ampliou o Calendário Básico de Vacinação da Criança, com a introdução da vacina pentavalente que previne contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B e meningites causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b (tabela 2). Esta começou a ser administrada em crianças com menos de sete anos de idade que estão iniciando ou completando o esquema de vacinação (BRASIL, 2012).

A introdução deste imunobiológico foi possível mediante a política do Ministério da Saúde, em fortalecer a capacidade nacional de inovação tecnológica de produção, não só em parceria com laboratórios públicos e com setor privado, mas também com parceiros internacionais para a transferência de tecnologia deste produto e a ampliação do número de vacinas combinadas (BRASIL, 2012).

Nesta perspectiva, o Ministério da Saúde no prazo de quatro anos, deverá transformar a vacina pentavalente em heptavalente, com a inclusão das vacinas poliomielite inativada (VIP) e meningite C conjugada, reunindo em apenas uma injeção, vários

componentes imunobiológicos. A vacina heptavalente será desenvolvida em parceria com os laboratórios FIOCRUZ/Bio-manguinhos, Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias (BRASIL, 2012).

Tabela 2 - Calendário vacinal do Ministério da Saúde, Estado de São Paulo, 2012.

Idade	Vacina
Ao nascer	BCG, Hepatite B
2 meses	Penta (DTP/Hib/HB), VIP, Rotavirus
3 meses	Pneumo 10 e MenC
4 meses	Penta (DTP/Hib/HB), VIP, Rotavirus
5 meses	Pneumo 10 e MenC
6 meses	Penta (DTP/Hib/HB), VOP
7 meses	Pneumo 10
9 meses	Febre amarela
12 meses	SCR, MenC
15 meses	VOP, DTP, Pneumo 10
4 a 6 anos	VOP, DTP, SCR
6 m e menores de 2 anos	Influenza
10 a 11 anos	dT
Adulto (20 a 59 anos)	dT
Idoso (60 anos ou mais)	dT

Fonte: Brasil, 2012.

A multivacinação é uma estratégia onde em um único momento são oferecidos a população várias vacinas ao mesmo tempo, a fim de melhorar a cobertura vacinal da população e otimizar a logística dos serviços de saúde (BRASIL, 2012).

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para realizar a qualificação de performance do biorreator (NBS-500L), por meio dos estudos de temperatura e pressão e de crescimento de *C. diphtheriae* para produção de toxina diftérica neste biorreator.

Para isto foram realizados os procedimentos prévios e obrigatórios de calibração, QI e QO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de calibração dos instrumentos de medição e controle e as qualificações do biorreator foram realizados com suporte da Garantia de Qualidade do Instituto Butantan.

Nas etapas de calibração e qualificação além das referências, foram utilizados manuais de operação, manutenção e protocolos, bem como das especificações das partes e peças mediante certificado do fabricante.

O trabalho iniciou com a elaboração e aprovação prévia dos protocolos para realizar os procedimentos de calibração e qualificação.

4.1 Calibração, QI e QO

As calibrações foram realizadas com base no estudo detalhado das partes e peças do equipamento e a partir de dados históricos de lotes de produção.

Os testes de QI foram realizados através de uma avaliação do equipamento em sua condição estática e foram executados de acordo com roteiros de testes. Foi avaliado se as especificações dos fabricantes estavam de acordo com as instalações físicas do biorreator.

Os testes de QO foram realizados através de uma avaliação do equipamento em sua condição dinâmica e foram executados de acordo com roteiros de testes que permitiram avaliar, se as operações com o biorreator estavam de acordo com os procedimentos de operação, incluindo as situações de pior caso, o desafio.

4.2 Sensores empregados nos testes de esterilização

4.2.1 Sensores de temperatura

Foi utilizado sensor de temperatura tipo PT 100, marca GE e modelo *Kaye*, acoplado ao equipamento de validação *Validator* modelo *Kaye* da empresa GE, para registro e

monitoramento da temperatura.

4.2.2 Sensor de pressão

Foi utilizado sensor de pressão marca GE e modelo *Kaye* conectado ao *Validator* modelo *Key* da empresa GE, para registro e monitoramento da pressão.

4.2.3 Indicadores Biológicos

Os indicadores biológicos contendo suspensão de esporos do *Bacillus stearothermophilus* marca Merck, modelo *Sterikon*® plus *Bioindikator* foram aplicados em diversos pontos durante os testes de esterilização no biorreator. Após cada ciclo, os indicadores biológicos foram incubados em banho-maria a 60 °C durante 48 horas, para verificar o crescimento do microrganismo indicador.

4.3 Teste de esterilização

O teste foi realizado através de três ciclos de esterilização com o biorreator vazio e linhas anexas como entradas e saídas, empregadas durante o processo de produção de toxina.

Sensores de temperatura e indicadores biológicos foram posicionados geometricamente no interior do biorreator e turbina de agitação (figura 2), e nas linhas anexas (figuras 3 e 4), além do sensor de pressão.

O estudo de temperatura e pressão foi realizado com vapor puro fluente em todo o interior do equipamento e linhas anexas. Os parâmetros de temperatura e pressão foram controlados e monitorados durante 60 minutos, pelo *programmable logic controller* (PLC).

Figura 2 - Distribuição dos sensores de temperatura e indicadores biológicos no interior do biorreator. (A) - Turbina do biorreator. (B) - Interior da dorna do biorreator.

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

Figura 3 - Sensores de temperatura e indicadores biológicos distribuídos nos filtros de entrada e saída do biorreator. (A) - Filtro esterilizante para entrada do meio de cultura no biorreator. (B) - Filtro hidrofóbico localizado na entrada de ar que alimenta o biorreator. (C) - Filtro hidrofóbico localizado na linha de exaustão do biorreator.

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

Figura 4 - Sensores de temperatura e indicadores biológicos distribuídos nas linhas anexas do biorreator. (A) - Linha de saída de produto (válvula fundo de tanque). (B) - Condensador do biorreator para os gases de exaustão. (C) - Conexão em “T” localizado na tampa superior do biorreator.

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

Nas mesmas condições de temperatura e pressão, foram realizados três ciclos de esterilização na válvula de inoculação (figura 5), com uso de vapor puro fluente no interior da válvula durante 30 minutos.

Figura 5 - Distribuição dos sensores de temperatura e indicador biológico. (A) - Entrada dos sensores pelo do tubo de silicone até a válvula. (B) - Conexão da válvula (lado interno com os sensores e indicador biológico).

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

Segue na tabela 3, o critério de aceitação utilizado como referência para a análise dos resultados, obtidos durante o estudo de temperatura e pressão no biorreator.

Tabela 3 - Critério de aceitação utilizado no estudo de temperatura e pressão durante os testes de esterilização do biorreator.

Teste	Critério de aceitação		
	Temperatura	Pressão	Tempo
Esterilização vazio + anexos	$\geq 121\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\geq 1,20\text{ bar}$	$60 \pm 2\text{ minutos}$
Válvula de inoculação	$\geq 121\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\geq 1,20\text{ bar}$	$30 \pm 1\text{ minuto}$

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

4.4 Estudo de crescimento de *C. diphtheriae*

4.4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos ensaios de crescimento para produção da toxina diftérica foi o *C. diphtheriae* cepa Park-Williams 8, variedade Toronto liofilizada, proveniente do Instituto Nacional de Salud Publica de Chile (ISP) (mesmo utilizado na rotina de produção), que foi recebido pela Seção de Vacinas Aeróbicas do Serviço de Bacteriologia da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do IB.

4.4.2 Meio de cultura

O Meio IB para produção de toxina diftérica (base: N.Z. Amine[®] tipo A), com digesto tríptico de caseína como fonte de nitrogênio e maltose como fonte de carbono (SAKAUCHI, 2003), empregado na rotina de produção, foi utilizado tanto no preparo do inóculo como para o crescimento no biorreator.

Para o preparo do meio, a concentração de Fe^{++} do N.Z.Amine foi verificada e sulfato ferroso foi adicionado para resultar na concentração final de $0,30\text{ }\mu\text{g/mL}$ de Fe^{++} no meio de

cultura final (concentração estabelecida pelo IB) e já também abordado por (TCHORBANOV; DIMITROV; VASSILEV, 2004).

O volume de meio de cultura correspondeu a 250 L para cada ensaio de crescimento no biorreator.

O meio de cultura pronto foi esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm , com o filtro conectado na linha de entrada da dorna do biorreator, previamente esterilizado a 121 $^{\circ}\text{C}$, com vapor puro fluente durante 60 minutos.

4.4.3 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado a partir do Lote de Trabalho IB-Cd/LT 01/12 que foi reconstituído com 1 mL de Meio IB para produção de toxina diftérica (base: N.Z. Amine[®] tipo A) e cultivado em meio semi-sólido de Löeffler (SUNDARAN; RAO; BOOPATHY, 2001) por 24 horas a 35 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O crescimento bacteriano foi repicado por duas vezes com 1 mL da cultura em 100 mL de Meio IB para produção de toxina diftérica (base: N.Z. Amine[®] tipo A) previamente adicionado de solução de cloreto de cálcio a 40% e incubado a 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante, durante 24 horas.

O terceiro repique em 1500 mL de Meio IB para produção de toxina diftérica (base: N.Z. Amine[®] tipo A), previamente adicionado de solução de cloreto de cálcio a 40%, foi incubado a 36 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante, durante 24 horas. Ao término, este cultivo correspondeu ao inóculo de produção para o biorreator.

Em todas as etapas foi realizada a avaliação da pureza (seção 4.5.4).

4.4.4 Biorreator

O equipamento consiste dos seguintes componentes, um suporte para fios, cabos, tubulação, válvulas, manômetros entre outros, um módulo de controle para programação, ajustes e acionamentos dos parâmetros de processo (painel de comando) e a dorna do

biorreator.

Foi utilizado o biorreator *New Brunswick Scientific* (figura 6) com capacidade útil de 500 L, com sistema de aeração na parte superior do equipamento para permitir aeração nos cultivos. As frequências de agitação em (rpm), foram promovidas pelas turbinas de disco rígido e pás planas, chamada turbinas Rushton. Parâmetros de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), fluxo de ar (L/min) e pressão na dorna (psi) foram controlados automaticamente.

A dorna do biorreator possui jaqueta de aquecimento ou resfriamento, visor frontal e superior, além de componentes como: condensador, disco de ruptura, conexões para sensores e lâmpadas, filtros na entrada e saída de ar, purgadores e bomba de circulação.

O sistema de selagem do mecanismo da agitação está localizado na parte inferior da dorna e a esterilidade/lubrificação do selo mecânico é mantida com uso de vapor puro fluente durante o processo, bem como a temperatura é controlada através de uma bomba de circulação e trocador de calor.

O equipamento é construído em aço inoxidável 316 L, a proporção da altura em relação ao raio é 3:1 e possui sistema *sterilizable in-place* (SIP).

A medida de oxigênio dissolvido foi realizada através de um sensor polarimétrico marca Mettler Toledo modelo *InPro*® 6800, instalado em um dos bocais inferiores da dorna, cuja calibração se baseou na saturação percentual do oxigênio dissolvido no meio, nas condições iniciais de fermentação. O pH foi determinado com um eletrodo marca Mettler Toledo modelo *InPro*® 3253/120/Pt1000 *combination* pH e instalado em um bocal inferior da dorna.

Um sensor de biomassa *on line* marca Optek, modelo 4202, com um conversor modelo C4202 e uma sonda modelo AS-16-VB-N, realizou as leituras de absorbância no comprimento de onda de 730 a 970 nm (NIR).

O controle é feito via interface homem-máquina (IHM) com um sistema integrado ao PLC, que permite durante todas as etapas de processamento, a visualização dos parâmetros no painel de comando (*display*).

Figura 6 - Biorreator *New Brunswick Scientific* - 500 L.

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

4.4.5 Amostragem no biorreator

As amostras foram coletadas em sistema fechado com utilização de bolsas plásticas com capacidade de 100 mL, marca *NovaSeptum* modelo AT11/2-310, previamente esterilizadas por raio gama. As bolsas foram acopladas em um dos bocais inferiores da dorna (figura 7) durante os ensaios de crescimento no biorreator.

Figura 7 - Bolsas plásticas estéreis para amostragem em sistema fechado e uso único.

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

4.4.6 Ensaios no biorreator

Foram analisados três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae* neste biorreator, contendo meio IB para produção de toxina diftérica.

O Inóculo de Produção foi introduzido assepticamente, mediante pressão positiva para o biorreator previamente esterilizado e contendo Meio IB para produção de toxina diftérica (base: N.Z. Amine[®] tipo A). O crescimento de *C.diphtheriae* para produção de toxina diftérica, foi de 64 horas $\pm$ 2 horas a temperatura de 35 °C $\pm$ 1 °C, com agitação em vórtex e introdução de ar estéril na superfície do cultivo. Durante os ensaios foram alterados os parâmetros de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Troca de parâmetros (*Set point*) das variáveis durante os ensaios de crescimento no biorreator.

Variáveis	Critério de aceitação		
	Tempo 0 h	Tempo 18 $\pm$ 2 h	Tempo 40 $\pm$ 2 h
Temperatura	35 °C	35 °C	35 °C
Agitação	300 rpm	350 rpm	370 rpm
Fluxo de ar	330 L/min	350 L/min	370 L/min
Pressão	14 psi	16 psi	17 psi

Fonte: Instituto Butantan, 2012.

Durante os três ensaios de crescimento, as amostras foram coletadas em um intervalo de 12 horas, para realização dos seguintes testes: absorbância, microscopia óptica e prova de pureza, além de cada amostra, um volume de 40 mL foi separado para centrifugação e o sobrenadante foi filtrado estéril em membrana 0,22 μ m, para determinação de Lf e SDS-PAGE.

Teste para verificar a presença de toxina diftérica intracelular, foi realizado com a ressuspensão do *pellet*, misturados a solução de cloreto de sódio 1 M, para análise adicional do rendimento do processo.

Parâmetros como pH, oxigênio dissolvido (OD) e o sensor de biomassa *on line*, foram monitorados automaticamente e registrados durante os três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae* neste biorreator.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação do Teor de Ferro

Foi realizada a determinação da concentração de Fe^{++} , nas amostras de meio de cultura utilizado nos ensaios de crescimento de *C. diphtheriae*, conforme realizado rotineiramente na produção (ANVISA, 2010).

4.5.2 Avaliação do crescimento

Foi utilizado um sensor de biomassa *on line*, que foi conectado em um dos bocais inferiores da dorna e acoplado ao conversor, que forneceu o registro e leitura das absorvâncias durante o crescimento de *C. diphtheriae* de forma automática.

A unidade de medida deste sensor é “unidades de concentração” (UC) e sua calibração foi realizada a cada início dos ensaios com o próprio meio de cultura contido no biorreator, antes da inoculação.

Além do sensor, foi realizada leitura da absorvância das amostras de crescimento de *C. diphtheriae*, coletadas durante os três ensaios consecutivos. Para estas leituras, foi utilizado espectrofotômetro marca Amersham Biosciences modelo Ultrospec 2100 pró, utilizando solução salina 0,85% como branco. Quando necessário, foram feitas diluições das amostras para que as leituras estivessem compreendidas na faixa de 0,2 a 0,8 unidades de absorvância.

Antes de iniciar as leituras de absorvância, foi realizado uma varredura espectral (scan) com uma amostra coletada no biorreator, que apresentou dois picos de leitura no

espectrofotômetro, a 530 nm e 590 nm (QUIGLEY, 2008), desta forma, foram realizadas leituras nestes dois comprimentos de onda, para verificação da correlação entre os valores de ambas leituras.

4.5.3 Determinação do limite de floculação (Lf/mL)

De acordo com a (ANVISA, 2010) o título mínimo especificado para a etapa de cultivo no biorreator é ≥ 40 Lf/mL.

A técnica consistiu na adição de quantidades variáveis de antitoxina diftérica de referência contendo 100 Lf/mL, em tubos de floculação e adição de 1 mL da amostra.

O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 45 °C. O primeiro tubo que apresentou floculação indicou o valor do título da toxina diftérica. O (Kf) correspondeu ao tempo em que ocorreu a floculação no primeiro tubo.

Para verificação de toxina intracelular, foi realizado a ressuspensão do *pellet*, que se formou na primeira centrifugação das amostras, com solução de cloreto de sódio 1 M, para o mesmo volume inicial da amostra. Em seguida foi transferido para um erlenmeyer e ficou sob agitação com barra magnética por 1 hora, em temperatura ambiente.

Após 1 hora, foi realizada outra centrifugação, onde o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 μ m, para determinação do Lf.

4.5.4 Avaliação da pureza

As amostras do preparo do inóculo de produção e as coletadas no biorreator, referente aos ensaios de crescimento de *C. diphtheriae*, foram submetidas a microscopia óptica.

Os esfregaços destas amostras foram corados pela técnica de Gram, para visualização morfológica de *C. diphtheriae*.

Foi também realizada prova de pureza com volume de 0,1 mL destas amostras, que foram inoculados em tubo de ensaio contendo meio Loeffler e mantidos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A cada teste, um tubo sem inoculação foi incubado em paralelo como controle negativo. Após o período de incubação destas amostras, foi observado o crescimento no meio Loeffler e em seguida os esfregaços das colônias foram examinados por microscopia óptica.

4.5.5 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) através do *Bio-Rad Protein Assay kit* (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

O teste consistiu com uma quantidade de 200 µl do reagente, misturados as amostras contendo a toxina diftérica, seguido da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão do teste foi realizada com BSA (*Bovine Serum Albumin*). A concentração de proteína foi calculada de acordo com a curva de regressão linear e a equação da reta, levando em consideração as respectivas diluições.

4.5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o objetivo de determinar a massa molecular das proteínas presentes nas amostras dos três ensaios produzidos no biorreator, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para a aplicação das referidas amostras, o gel de acrilamida foi preparado a uma concentração de 12% para o gel de corrida e de 4% para o gel de empilhamento. Todas as amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho de água fervente na presença de 2-mercaptoetanol. A corrida foi realizada nas seguintes condições: 100 mA por 1 hora e 30 minutos em tampão Tris-glicina 0,25 M e SDS a 1%. Uma alíquota de padrões de massa molecular (*LMW-SDS Marker Kit, GE Healthcare*) também foi aplicada ao gel. Os gel referente as amostras foram corados com *Cromassie Blue 250 R*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Calibração, QI e QO

As calibrações dos instrumentos de medição e controle apresentaram resultados que estão conforme os critérios de aceitação de cada um dos instrumentos calibrados, assegurando que os valores informados pelo instrumento foram seguros e confiáveis.

De acordo com os roteiros de testes, os protocolos de QI foram executados e posteriormente foi concluído o relatório de QI, contemplando todos os registros que comprovaram que a instalação atendeu aos requerimentos do usuário e especificações do fabricante, bem como os certificados dos materiais que se encontraram dentro dos prazos de validade.

De acordo com os roteiros de testes, os resultados dos diferentes testes funcionais e de falta emergencial de utilidades, simulando situações críticas de modo a desafiar o equipamento, demonstraram que o biorreator foi certificado quanto a QO. Posteriormente foi concluído o relatório de QO, contemplando todos os registros que comprovaram que o equipamento, atendeu aos critérios de aceitação quanto à segurança, operação e robustez do biorreator, dentro das BPF.

Os procedimentos de calibração, QI e QO, que são pré-requisitos para realizar uma QP, foram plenamente satisfatórios, de acordo com (BRASIL, 2005).

5.2 Teste de esterilização

Nos testes iniciais de esterilização com o equipamento vazio, foi identificado um problema no dreno, que não suportou a vazão de água requerida no estágio de resfriamento do biorreator após o processo de esterilização, ocasionando uma demora no tempo de resfriamento, que levou quatro horas e meia e mesmo assim não foi possível atingir a temperatura final requerida (*Set point* 35 °C), portanto o processo foi interrompido.

Diante desta situação, a linha de dreno foi modificada, com a inclusão de mais um

ponto de drenagem para atender a vazão de água requerida nesta etapa de resfriamento.

Após teste realizado com esta modificação, o resultado atendeu aos parâmetros requeridos para o ciclo de esterilização e resfriamento, sem comprometimento do processo, bem como da segurança dos operadores.

Um desvio também foi observado no sensor/controlador do fluxo de entrada de ar durante os testes iniciais, que apresentou erro superior a 50% do valor requerido pelo *set point*, por falha na comunicação junto ao PLC. O desvio foi corrigido com a substituição do sensor/controlador do fluxo de ar pelo fabricante. Depois de solucionado estes problemas foram iniciados os ciclos de esterilização do biorreator.

Para análise dos resultados do estudo de temperatura foi utilizado o Microsoft Excel 2010.

As curvas de temperatura e pressão referentes ao 1º, 2º. e 3º. ciclos de esterilização com o biorreator vazio, estão apresentados nas figuras 08, 09 e 10.

Figura 8 - Curvas de temperatura e pressão do 1º. ciclo de esterilização no biorreator vazio.

- - - Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- - - Set point da pressão ($\geq 1,20$ bar).
- - - Intervalo de 60 minutos da temperatura e pressão no Set point.

Figura 9 - Curvas de temperatura e pressão do 2º. ciclo de esterilização no biorreator vazio.

- Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- Set point da pressão ($\geq 1,20$ bar).
- Intervalo de 60 minutos da temperatura e pressão no Set point.

Figura 10 - Curvas de temperatura e pressão do 3º. ciclo de esterilização no biorreator vazio.

- Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- Set point da pressão ($\geq 1,20$ bar).
- Intervalo de 60 minutos da temperatura e pressão no Set point.

As linhas tracejadas em vermelho destacam o limite mínimo que a temperatura deve se manter para aprovação no teste de esterilização. As curvas de temperatura visualizadas nas figuras 08, 09 e 10, referentes aos doze sensores distribuídos no interior do biorreator, mostraram que durante os três ciclos, a temperatura atendeu ao critério de aceitação, atingindo valores superiores ao mínimo requerido para o processo de esterilização neste equipamento (≥ 121 °C). Junker et al. (2006) descreveu a utilização esterilização por vapor em biorreator com temperatura de 122 °C por 40 ou 45 minutos. Neste trabalho a temperatura ficou acima de 121 °C durante 60 minutos nos três ciclos realizados.

Ainda nas figuras 08, 09, e 10 foram observados que os intervalos de tempo entre a etapa de esterilização como aquecimento e resfriamento, foram suficientes e demonstraram que as curvas de aquecimento e resfriamento atenderam ao especificado (*Recipe*/PLC) para o referido ciclo de esterilização neste biorreator.

As curvas de pressão visualizadas nas figuras 08, 09 e 10 e geradas em função da elevação da temperatura, indicaram que a pressão durante os três ciclos, atenderam ao mínimo requerido, como indicado pela linha tracejada verde, para o processo de esterilização ($\geq 1,20$ bar), bem como, o intervalo de tempo que o equipamento foi submetido à esterilização de suas superfícies internas, que tem contato direto ou indireto com o produto e se apresentaram dentro do tempo requerido para o processo de esterilização (60 minutos).

Não foram observadas variações entre os sensores de temperatura e pressão como esperado pelos padrões de qualidade, atendendo ao critério de aceitação para o processo de esterilização do biorreator vazio.

Os anexos como linhas de entrada do filtro esterilizante do meio, entrada e saída de ar, válvula de saída de produto e de retorno para a dorna, que até então não eram monitorados, foram acrescentados ao estudo de qualificação de performance através de sensores de temperatura e pressão e indicadores biológicos. A esterilização destes anexos foi concomitante aos ciclos do biorreator vazio e nas mesmas condições de pressão.

As curvas dos três ciclos de esterilização dos anexos estão apresentadas nas figuras

11, 12 e 13.

Figura 11 - Curvas de temperatura do 1º. ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.

--- Set point da temperatura (≥ 121 °C).

--- Intervalo de 60 minutos da temperatura no Set point.

Figura 12 - Curvas de temperatura do 2º. ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.

--- Set point da temperatura (≥ 121 °C).

--- Intervalo de 60 minutos da temperatura no Set point.

Figura 13 - Curvas de temperatura do 3º. ciclo de esterilização dos anexos do biorreator.

- - - Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- - - Intervalo de 60 minutos da temperatura no Set point.

As linhas tracejadas em vermelho destacam o limite mínimo que a temperatura deve se manter, para aprovação durante os ciclos de esterilização dos anexos. As curvas de temperatura visualizadas nas figuras 11, 12 e 13, referentes aos oito sensores distribuídos nos anexos do biorreator mostraram a eficiência dos ciclos de esterilização dos anexos bem como os parâmetros de aquecimento e resfriamento.

Outro importante aspecto considerado foi determinar que a válvula de inoculação, deveria ser submetida também ao processo de esterilização, como um ciclo independente e reprodutível de forma segura. Liu (2013) ressalta a importância em manter as operações assépticas, de acordo com a especificidade de um processo ou de um equipamento, através de esterilizações pontuais e assim eliminar os riscos de contaminações, a válvula de inoculação seria um destes pontos.

A válvula de inoculação foi submetida a três ciclos de esterilização, com uso de vapor saturado puro fluente por 30 minutos e monitoramento da temperatura e pressão através do uso de dois sensores de temperatura e um de pressão, bem como de um indicador biológico dentro da conexão com a referida válvula.

As curvas de temperatura e pressão do 1º, 2º. e 3º. ciclos de esterilização desta válvula estão apresentadas nas figuras 14, 15 e 16 respectivamente.

Figura 14 - Curvas de temperatura e pressão do 1º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.

- - - - - Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- - - - - Set point da pressão ($\geq 1, 20$ bar).
- - - - - Intervalo de 30 minutos da temperatura e pressão no Set point.

Figura 15 - Curvas de temperatura e pressão do 2º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.

- - - - - Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- - - - - Set point da pressão ($\geq 1, 20$ bar).
- - - - - Intervalo de 30 minutos da temperatura e pressão no Set point.

Figura 16 - Curvas de temperatura e pressão do 3º ciclo de esterilização da válvula de inoculação.

- - - Set point da temperatura (≥ 121 °C).
- - - Set point da pressão ($\geq 1, 20$ bar).
- - - Intervalo de 30 minutos da temperatura e pressão no Set point.

As análises das curvas de temperatura e pressão (figuras 14, 15 e 16), obtidas durante os ciclos de esterilização da válvula de inoculação, mostraram também a eficiência do processo de esterilização, tornando este ponto menos crítico.

Os resultados de todos os indicadores biológicos, distribuídos em todos os pontos monitorados, apresentaram resultado negativo, ou seja, ausência de crescimento do *Bacillus stearothermophilus* após 48 h de incubação em banho-maria, demonstrando eficiência de esterilização nas superfícies internas do biorreator monitoradas durante o processo.

No IB, equipamentos e materiais utilizados na produção de vacinas, incluindo a produção de toxina diftérica, que tem contato direto ou indireto com o produto, são esterilizados por calor, por meio do uso de vapor saturado puro. Junker et al. (2006) descreve que para cada tipo de processo de crescimento microbiano deve ser avaliado individualmente, no que diz respeito a requerimentos de esterilização e tendência dos contaminantes.

Até então no IB, somente eram monitoradas as partes internas da dorna do

biorreator com distribuição dos sensores de temperatura no seu interior.

O estudo de temperatura e pressão foi iniciado com a determinação de pontos críticos de acordo com a especificidade deste processo, garantindo inclusive a esterilização de filtros utilizados durante o processo (CHISTI, 2005) neste biorreator.

A análise crítica de cada processo deve ser determinada pela sua especificidade Junker et al. (2006). Este estudo considerou a especificidade deste processo quando da procura destes pontos críticos.

Estes pontos corresponderam às linhas anexas e válvula de inoculação, conforme abordado também por (LIU, 2013) que descreve as esterilizações em tubulações anexas ao biorreator, que foram verificadas durante os testes iniciais de esterilização e comprovaram que as temperaturas nestes pontos não estavam atingindo o requerido para o processo (≥ 121 °C). Berovick (2005) descreveu que manter a esterilidade, representa uma das mais importantes etapas de um processo biológico.

A presença de cantos mortos nestas linhas anexas bem como a atuação dos purgadores de vapor de forma ineficiente, evidenciaram a necessidade de corrigir estes problemas para dar início aos ciclos de esterilização. Isto justificou a inclusão das linhas anexas e válvula de inoculação no estudo de temperatura e pressão para este biorreator, visando assegurar os lotes de produção sem comprometimento do produto.

A certificação da eficiência da esterilização com a eliminação dos possíveis focos de contaminação garante a aplicação segura e eficaz do produto, obtido inclusive neste biorreator e reforça segundo Chisti (2005) que a manutenção da esterilidade é um dos principais conceitos das indústrias farmacêuticas.

5.3 Estudo de crescimento de *C. diphtheriae*

Com intuito de aprimorar a qualificação de performance, após o estudo de temperatura e pressão, foi realizado um estudo de crescimento de *C. diphtheriae* visando a produção de toxina diftérica, através de três ensaios para analisar a performance deste novo

biorreator com o produto e assim incluir também dados de crescimento.

Este tipo de estudo de performance de um equipamento ou de uma etapa de processo, foi também realizado por Min et al. (2008), porém, para um processo de cromatografia e avaliou se o produto atendeu as especificações do processo.

A questão do ferro para produção de toxina diftérica já foi amplamente estudada e alguns grupos, como Sundaran, Rao e Boopathy (2001), descreveram que o excesso de Fe^{++} no meio de cultura final pode prejudicar a produção de toxina. Tchorbanov, Dimitrov e Vassilev (2004) obtiveram ótimos rendimentos em produção de toxina diftérica, com concentrações de Fe^{++} que variaram de 0,05 a 0,41 $\mu\text{g/mL}$ e baixos rendimentos em concentrações acima de 0,90 $\mu\text{g/mL}$ de Fe^{++} no meio de cultura final.

A questão do pH utilizado no meio de cultura (pH 7,6) no IB considerou a menor incorporação de Fe^{++} pela utilização da maltose que permite menor acidificação do meio e consequente aumento na liberação da toxina (RUSSELL; HOLMES, 1983).

Os controles de processo do meio de cultura atualmente utilizados no IB, para determinação do teor de Fe^{++} e pH (tabela 5) se apresentaram dentro das especificações determinadas para a produção de toxina diftérica no Instituto utilizando este biorreator.

Tabela 5 - Resultado dos controles do meio de cultura preparado para os três ensaios de *C.diphtheriae* no biorreator.

Controle de processo	Ensaio no biorreator			Especificação
	1	2	3	
Determinação do Teor de Fe^{++}	0,29	0,30	0,28	0,30 $\mu\text{g Fe}^{++}$ (*)
Determinação de pH	7,59	7,60	7,63	7,6 $\pm$ 0,1

(*) desvio padrão ($\pm$ 0,06 μg).

5.3.1 Ensaios de crescimento de *C. diphtheriae* no biorreator

Os esfregaços corados por Gram referentes às etapas de preparo do inóculo e crescimento no biorreator apresentaram bacilos gram positivos agrupados entre si, com

formação de figuras características desta espécie que lembram letras chinesas.

O crescimento das amostras provenientes do preparo do inóculo e do crescimento no biorreator cultivadas em tubo contendo meio Loeffler por 24 horas, apresentaram as minúsculas colônias de cor creme e convexas. A confirmação destas colônias foi avaliada novamente pela microscopia óptica.

5.3.2 Correlação das leituras nas DO_(530nm) e DO_(590nm)

Um plano de amostragem foi determinado para estudar o crescimento de *C. diphtheriae*, como descrito na seção 4.4.6. As leituras de absorbância foram obtidas no espectrofotômetro, em dois comprimentos de onda e as correlações das curvas de DO, estão apresentadas nas figuras 17, 18 e 19.

Para análise dos estudos de crescimento foi utilizado o Microsoft Excel 2010 e o software OriginPró 7.0, do Laboratório de Fermentação do Centro de Biotecnologia do IB. Com base nos dados, foram calculadas a regressão linear e a equação da reta.

Figura 17 - Correlação das curvas de biomassa DO_(530nm) e DO_(590nm), obtidas durante o 1º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 18 - Correlação das curvas de biomassa DO_(530nm) e DO_(590nm), obtidas durante o 2º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 19 - Correlação das curvas de biomassa DO_(530nm) e DO_(590nm), obtidas durante o 3º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

De acordo com as figuras 17, 18 e 19, os resultados das leituras de DO nos dois comprimentos de onda, referente aos três ensaios no biorreator, apresentaram valores de $R^2 = 0,9911$, $0,9963$ e $0,9966$ respectivamente, bem como o desvio padrão foi de $0,8286$ (ensaio1), $0,4775$ (ensaio 2) e $0,1612$ (ensaio 3) demonstrando correlação entre ambas as leituras.

Com este resultado, os dados de biomassa para analisar o crescimento de *C. diphtheriae* no novo biorreator, foram calculados com base nos valores obtidos no comprimento de onda DO (590nm) . Este comprimento de onda foi utilizado também por SAKAUCHI (2003). A leitura em 600 nm é a leitura tradicional para o crescimento celular e obviamente leva em conta a cor do meio que afeta a absorbância. Para os meios amarelados o comprimento ao redor de 600 nm funciona muito bem (QUIGLEY, 2008).

Durante os três ensaios no biorreator foram coletadas amostras em um intervalo de tempo de 12 h , para leitura das DO (590nm) no espectrofotômetro e também foi utilizado um sensor de biomassa *on line*, conforme descrito na seção 4.5.2 para analisar o comportamento das curvas entre as respectivas leituras de absorbância (sensor x espectrofotômetro) (figura 20).

Os resultados das curvas de biomassa estão apresentados na figura 20.

Figura 20 - Curvas de biomassa DO (590nm) e do sensor de biomassa *on line*, obtidas durante os três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae*.

O perfil das curvas de crescimento foi apresentado na figura 20 e mostrou similaridade entre as curvas obtidas com os valores do sensor de biomassa *on line* e do espectrofotômetro para os três ensaios no biorreator.

Entretanto, a curva obtida com os dados do espectrofotômetro não permitiu identificar a fase exponencial, devido ao intervalo de amostras ter sido de 12 horas e consequente número reduzido de pontos para esta identificação.

Já com os valores do sensor, por ter uma leitura com maior número de pontos, o que é uma vantagem para visualizar o crescimento durante todo o tempo, foi possível identificar a fase exponencial que foi observada ao redor do tempo de 11 horas até 24 horas, quando após este tempo, visualizou-se o declínio da curva indicando a diminuição do crescimento bacteriano.

Analisando o perfil das curvas durante os três ensaios, observa-se que este declínio também acontece nas leituras de DO_(590nm) no tempo de 24 horas, entretanto, o comportamento das curvas de crescimento obtidas com os dois métodos, são muito similares ao longo das 64 horas de cultivo. Destaca-se também, que após o tempo de 60 horas para ambos os métodos, referentes aos três ensaios, apresentam um declínio na curva indicando o término da fase estacionária. No tempo de 64 horas os cultivos foram finalizados.

A análise da produção de toxina diftérica foi verificada com as leituras de DO, pelo fato da determinação do limite de floculação ter sido realizada com as amostras coletadas no intervalo de 12 horas.

Figura 21 - Curvas de biomassa DO $_{(590nm)}$ e produção de toxina diftérica, durante os três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae*.

A figura 21 mostrou que a produção de toxina diftérica iniciou a partir de 36 horas de cultivo correspondendo aproximadamente à 18 unidades de absorvância e que estas unidades já poderiam ser correlacionados aos limites de floculação (Lf/mL). No tempo de 48 horas foram observados títulos de toxina diftérica ao redor de 40 Lf/mL. No tempo de 24 horas, títulos de toxina diftérica em torno de 20 Lf/mL foram observados por Sakauchi (2003) e não nas condições deste trabalho. Entretanto, ao final dos cultivos, os valores de Lf/mL foram semelhantes, ao redor de 110 Lf/mL, como anteriormente observado por (SAKAUCHI, 2003).

No tempo de 60 horas, foi observado a produção máxima de toxina diftérica, com título de 100 Lf/mL (ensaios 1 e 3) e 110 Lf/mL (ensaio 2), correspondendo a valores de DO $_{(590nm)}$ entre 22 e 24 unidades de absorvância.

Ao final do cultivo, tempo de 64 horas, foi observado um declínio nos valores de DO $_{(590nm)}$, atingindo valores próximos a 18 unidades de absorvância. Porém, não houve alteração nos títulos de toxina diftérica neste tempo de cultivo, indicando que o tempo restante de 4 horas até o final do cultivo, não interferiu no título da toxina.

A queda da DO observada no tempo de 64 horas estaria mais relacionada com a pureza antigênica do produto após colheita do que propriamente com o título. Lise e liberação de proteínas intracelulares no meio pode estar relacionada com a diminuição verificada dos valores da DO.

Os resultados dos títulos de toxina diftérica obtidos ao final do cultivo nos três ensaios neste biorreator apresentaram valores superiores ao mínimo ≥ 40 Lf/ml. Conforme especificado pela (ANVISA, 2010) valores inferiores a 40 Lf/mL indicam interrupção do processo produtivo da toxina.

Em condições de bancada (biorreator de 2 L) Tchorbanov, Dimitrov e Vassilev (2004) apresentaram títulos de 90 Lf/mL com 40 horas de cultivo e concentração de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ Fe^{++} .

Uma troca dos parâmetros (*Set point*) das variáveis como: agitação, pressão e fluxo de ar (seção 4.4.6) está prevista no tempo de 40 horas, de acordo com as especificações descritas para produção de toxina diftérica no IB.

A figura 20 que contém os valores de absorbância obtidos com o sensor de biomassa *on line*, sugeriu uma antecipação desta rotina para as 24 horas de cultivo, devido a inclinação observada da curva na fase exponencial que poderia estar relacionada com falta de oxigênio neste momento.

Em complemento aos resultados da determinação do limite de floculação, os resultados do teste intracelular com as amostras coletadas nos três ensaios, não apresentaram floculação nas amostras analisadas.

5.3.3 Correlação entre valores do sensor de biomassa e DO (590nm)

Foi acrescentado neste trabalho, um estudo com um sensor de biomassa *on line*, para analisar o crescimento de *C. diphtheriae* e correlacionar os valores obtidos com os valores das leituras realizadas com as amostras, no espectrofotômetro e estes dados estão apresentados nas figuras 22, 23 e 24.

Figura 22 - Correlação das curvas do sensor de biomassa *on line* e das leituras de DO (590nm) durante o 1º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 23 - Correlação das curvas do sensor de biomassa *on line* e das leituras de DO (590nm) durante o 2º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 24 - Correlação das curvas do sensor de biomassa *on line* e das leituras de DO _(590nm) durante o 3º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Os resultados das correlações apresentaram valores de $R^2 = 0,9564$, $0,9489$ e $0,9785$ respectivamente, demonstrando correlação entre ambas as leituras. Estes resultados podem indicar a possibilidade de introduzir este sensor de biomassa para o monitoramento do processo de forma segura, automática e *on line* durante o crescimento de *C. diphtheriae* neste biorreator.

Siripatrawan et al. (2010) utilizaram também sensor de leitura na proximidade do infra vermelho (NIR) associado com outros fatores métricos como regressão linear múltipla (MLR), análise discriminante de fator (DFA) e componente principal de análise de regressão (PCR) para detecção de *E. coli* em diferentes concentrações durante crescimento. Obtiveram coeficientes de regressão em torno de $R^2 = 0,98$ quando comparado ao método apenas utilizando sensor. Sensores do tipo NIR são sistemas de detecção que não requerem especialistas no local além de serem sistemas não destrutivos, rápidos, repetitivos e livres de reagentes químicos (SIRIPATRAWAN et al., 2010).

As velocidades específicas que representam as taxas de crescimento celular

definidas pelo aumento na massa celular por unidade de tempo comumente representadas pelo símbolo (μ) estão apresentadas nas figuras 25, 26 e 27 e foram calculadas com base nos valores obtidos com o sensor de biomassa *on line*.

Figura 25 - Velocidade específica (μ) durante o 1º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 26 - Velocidade específica (μ) durante o 2º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 27 - Velocidade específica (μ) durante o 3º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Os resultados de (μ) foram: 0,066 (ensaio 1), 0,068 (ensaio 2) e 0,060 (ensaio 3), com valores de $R^2 = 0,9869$, 0,9864 e 0,9889 respectivamente.

Estes resultados comprovaram a eficiência desta determinação e permitiu sua utilização na qualificação da performance do biorreator no que se refere ao monitoramento do crescimento *C. diphtheriae* neste novo biorreator.

O monitoramento do pH e oxigênio dissolvido foram realizados com sensores e as respectivas curvas estão apresentadas nas figuras 28, 29 e 30.

Figura 28 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 1º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 29 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 2º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

Figura 30 - Curvas de pH e oxigênio dissolvido obtidas durante o 3º ensaio de crescimento de *C. diphtheriae*.

O comportamento observado do pH e do oxigênio dissolvido durante os três ensaios de crescimento de *C. diphtheriae* no biorreator foi o esperado para a rotina de produção.

Durante o preparo do meio de cultura para os ensaios, o pH foi ajustado para $7,60 \pm 0,10$ e logo após o procedimento de inoculação, observa-se que no tempo 0 hora (figuras 28 e 30) o pH caiu entre 6,70 -7,10.

Esta queda de pH provavelmente estaria relacionada ao próprio inóculo (pH 6,0 -7,0) e também à adição da solução de cloreto de cálcio a 40% momentos antes da inoculação, para favorecer a precipitação de sais e de ferro. Uma provável ação que minimizaria esta queda de pH é a utilização da maltose como fonte de carbono no meio de cultura. Isto ocasionaria formação mais lenta de ácidos carboxílicos evitando sua rápida oxidação. É conhecido que o pH ácido durante o tempo todo de cultivo interromperia a produção da toxina diftérica (SAKAUCHI, 2003).

A partir das 36 horas de cultivo, com o aumento do pH a produção da toxina foi iniciada. Após as 60 horas de cultivo já não houve alterações consideráveis de pH e os valores

máximos de toxina diftérica foram atingidos. Valores de pH ao redor 7,0 são ideais e correspondem aos maiores valores de Lf da toxina fato também observado por Tchorbanov, Dimitrov e Vassilev (2004).

O perfil das curvas de oxigênio dissolvido (figuras 28, 29 e 30) mostraram que o oxigênio dissolvido (%) foi praticamente consumido durante os três ensaios ao longo do processo.

Os parâmetros de pH e oxigênio dissolvido somente foram monitorados durante o crescimento de *C. diphtheriae* no biorreator. Este procedimento já é utilizado na rotina de produção.

Os controles em processo realizados neste estudo, durante as etapas de preparo do inóculo e meio de cultura (seções 4.5.4 e 4.5.1), bem como parâmetros utilizados durante o crescimento de *C. diphtheriae* (seção 4.4.6), em escala industrial neste novo biorreator, corresponderam aos valores já estabelecidos na rotina de produção da toxina diftérica no IB.

5.3.4 Perfil eletroforético da toxina diftérica

O perfil eletroforético da toxina diftérica, obtida durante os três ensaios no biorreator, nos tempos de 48h e 64h, estão apresentados na figura 31.

Figura 31 - Eletroforese em Gel de Acrilamida (SDS-PAGE) com coloração *Cromassie Blue* 250 R das amostras referentes aos ensaios no biorreator. Padrão de massa molecular *Low Molecular Weight*; 2 - ensaio 1 (48 h); 3 - ensaio 1 (64 h); 4 - ensaio 2 (48 h); 5 - ensaio 2 (64 h); 6 - ensaio 3 (48 h); 7 - ensaio 3 (64 h).

As amostras foram aplicadas na concentração de 10 µg/mL de proteína. As bandas da toxina nas amostras coletadas no tempo de 48 horas foram menos intensas, quando comparadas com as amostras de tempo 64 horas como comprovadas pelo aumento do título do Lf/mL. No tempo de 48 horas apresentaram títulos ao redor de 30 Lf/mL e para o tempo de 64 horas títulos ao redor de 110 Lf/mL.

A massa molecular de aproximadamente 58kDa, como mostrado pelas bandas majoritárias detectadas, demonstraram que a proteína está em sua forma íntegra de cadeia polipeptídica única e não foi clivada nos fragmentos A e B (PAPPENHEIMER, 1984).

Outras proteínas de massa molecular abaixo de 58 kDa, foram também observadas e provavelmente são oriundas do meio de cultura ou de proteínas inespecíficas geradas pelo *C. diphtheriae* durante o crescimento no biorreator (GUILHEN, 2005).

A padronização de protocolos disponíveis, não é o bastante para atender a um processo específico e isto justificaria a necessidade de se estudar um processo produtivo e realizar exercícios que comprovem sua eficiência e segurança. Neste caso a análise da aplicação do biorreator em uma das etapas de produção da toxina diftérica para produção da antoxina diftérica componente de vacinas bacterianas para uso humano.

Vale ainda ressaltar que este trabalho de qualificação de performance deste novo biorreator, foi importante não somente para atender os órgãos regulatórios, através dos registros das diferentes etapas de qualificação com relação a QI e QO, mas sobretudo, acrescentar e documentar estudos mais específicos como neste caso, o estudo de temperatura, pressão e análise do crescimento de *C. diphtheriae*.

6 CONCLUSÃO

O estudo de temperatura e pressão desenvolvido para este biorreator demonstrou a eficiência do equipamento e permitiu a certificação de processos robustos de esterilização, inclusive com a inclusão de novos pontos considerados críticos e testados, medidos por sensores e indicadores apropriados. O equipamento foi considerado qualificado na sua performance durante o processo produtivo específico além de estar qualificado em termos de instalação e operação.

A etapa principal da QP foi o estudo de crescimento microbiano avaliado pelas suas curvas que apresentaram o aumento esperado e semelhante da biomassa para os três ciclos estudados.

A introdução do sensor de biomassa *on line* demonstrou similaridade de resultados em comparação com o espectrofotômetro convencional através da correlação das leituras de DO_(590nm), e pelo fato de ser um instrumento de leitura automática e *on line* se enquadra adequadamente às normas vigentes.

A pureza dos cultivos foi determinada pela coloração de Gram que apresentou apenas bacilos *C. diphtheriae* com sua morfologia conhecida.

A toxina diftérica determinada a partir das 48 horas de cultivo teve seu rendimento analisado pela determinação do limite de floculação e foi caracterizada bioquimicamente (banda de 58kDa).

A QP do biorreator realizada neste estudo permitiu a introdução deste novo equipamento na rotina de produção da toxina diftérica.

REFERÊNCIAS*

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, 546 p.

AGNIHOTRI, A.; KAUR, S.; KUMAR, J.; CHAHAL, R. Performance qualification : critical to validation. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 7, p. 4-5, 2013.

BEROVIC, M. Sterilization in biotechnology. **Biotechnology Annual Review**, Askerceva, Slovenia, v. 11, p. 257-279, 2005.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. 16th ed., São Paulo, SP, 1975.

BISSUMBHAR, B.; RAKHMANOVA, A. G.; BERBERS, G. A. M.; IAKOLEV, A.; NOSIKOVA, E.; MELNICK, O.; OVTCHARENKO, E.; RÜMKE, H. C.; RUITENBERG, E. J. Evaluation of diphtheria convalescent patients to serve as donors for the production of anti-diphtheria immunoglobulin preparations. **Vaccine**, Amsterdam, The Netherlands, v. 22, p. 1886-1891, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 abr. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico das boas práticas de fabricação de produtos intermediários de insumos farmacêuticos ativos. RDC nº 249, de 13 de setembro de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Imunizações**. Brasília. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 21 out. 2012.

CANTER, H. M.; SILVA, A. V. da. **100 anos de Butantan**. São Paulo, 2000. 73 p.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2012.

CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; EFSTRATIOU, A.; DOVER, L. G.; HOLDEN, M. T. G.; PALLAN, M.; BENTLEY, S. D.; BESRA, G. S.; CHURCHER, C.; JAMES, K. D.; ZOYSA, A. DE; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; MOULE, S.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K. M.; THOMSON, N. R.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. **Nucleic Acids Research**, Hinxton, v. 31, p. 6516-6523, 2003.

CHISTI, Y. Sterilization of biotechnology products. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, New Zeland, v. 23, p.373, 2005.

CIANCIULLI, C.; WÄTZIG, H. Analytical instrument qualification in capillary electrophoresis, **Electrophoresis**, Braunschweig, Germany, v. 33, p. 1499-1508, 2012.

COLLIER, R. J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. **Toxicon**, Boston, USA, v. 39, p. 1793-1803, 2001.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. 4th ed., Philadelphia, Pennsylvania, 1990.

DIAS, D. S. W. Imunidade as infecções. In: BIER, O G.; MOTA, I.; DIAS DA SILVA, W. **Imunologia Básica e Aplicada**. 4. ed. Rio de Janeiro, 1989. cap. 17, p. 424-486.

FOOD DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Process validation**: general principles and practices. Guidance for industry. Pharmaceutical cGMPs. January 2011.

FREEMAN, V. J. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheria*. **J. Bacteriol.**, v. 61, p. 61-675, 1951.

GUILHEN, F. B. **Análise dos perfis de proteínas nas diversas etapas de produção e purificação das anatoxinas tetânicas e diftéricas - padronização de controles de qualidade internos**. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

HOLMES, R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. **The Journal of Infections Diseases**, USA, 2000.

IWAKI, M.; HORIUCHI, Y.; KOMIYA, T.; FUKUDA, T.; ARAKAWA, Y.; TAKAHASHI, M.; toxoid flocculation assay by laser light-scattering. **J. Immunol. Methods**, v. 318, p. 136-148, 2007.

JUNKER, B.; LESTER, M.; LEPORATI, J.; SCHMITT, J.; KOVATCH, M.; BORYSEWICZ, S.; MACIEJAK, W.; SEELEY, A.; HESSE, M.; CONNORS, N.; BRIX, T.; CREVELING, E.; SALMON, P. Review. sustainable reduction of bioreactor contamination in an industrial fermentation pilot plant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Rahway, USA, v. 102, p. 251-268, 2006.

KAMINSKI, L.; DEGENHARDT, M.; ERMER, J.; FEUBNER, C.; HÖWER-FRITZEN, H.; LINK, P.; RENGEL, B.; TEGTMEIER, M.; WÄTZIG, H. Efficient and economic HPLC performance qualification. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Braunschweig, Germany, v. 51, p. 557-564, 2010.

LIU, S. Bioreactor design and operation. **Bioprocess Engineering**, Syracuse, NY, USA, p. 915-964, 2013.

LÜBBERT, A.; JORGENSEN, S. B. Bioreactor performance: a more scientific approach for practice. **Journal of Biotechnology**, Weinbergweg, Germany, v. 85, p. 187-212, 2001.

MANCINI, F.; MONACO, M.; PATARACCHIA, M.; HUNOLSTEIN, C. V.; PANTOSTI, A.; CIERVO, A. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Viale Regina Elena, Rome, Italy, v. 73, p. 111-120, 2012.

MIN, B. J.; KANG, S. W.; SONG, Y. S.; LEE, J. H. ; KIM, S. W.; PARK, C.; KIM, C. W. Validation for capture anion exchange chromatography process in r-hGH manufacturing. **Process Biochemistry**, Seoul, Republic of Korea, v. 43, p. 808-815, 2008.

MOHAMMED-ZIEGLER, I.; MEDGYESI, I. Increased importance of the documented development stage in process validation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Hungria, v. 20, p. 283-285, 2011.

MOKROUSOV, I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives. **Infection, Genetics and Evolution**, Rússia, v. 9, p. 1-15, 2009.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Editora, 2000. 255 p.

MURPHY, J. R. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. **Toxins**, Boston, USA, v. 3, p. 294-308, 2011.

MURPHY J. R.; LOVE, J. E. *Corynebacterium diphtheriae*: iron-mediated activation of DtxR and regulation of diphtheria toxin expression. **Gram-positive Pathogens**. Washington DC, 2000.

NASCIMENTO, D. V.; LEMES, E. M. B.; QUEIROZ, J. L. S.; SILVA JR, J. G.; NASCIMENTO, H. J.; SILVA, E. D.; HIRATA JR, R.; DIAS, A. A. S. O.; SANTOS, C. S.; PEREIRA, G. M. B.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; ARMOA, G. R. G. Expression and purification of the immunogenically active fragment B of the park willians 8 *Corynebacterium diphtheriae* strain toxin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 43, p. 460-466, 2010.

PAPPENHEIMER, A. M. JR. Diphtheria. In: GERMANIER, R. **Bacterial vaccines**. New York, 1984. p. 1-36.

PRENETA-BLANC, R.; RIGSBY, P.; WILHELMSSEN, E. S.; TIERNEY, R.; BRIERLEY, M.; SESARDIC, D. Calibration of replacement international standards of diphtheria and tetanus toxoids for use in flocculation test. **International Association for Biologicals**, Hertfordshire, UK, v. 36, p. 315-326, 2008.

QUIGLEY, T. Monitoring the growth of E. Coli with light scattering using the synergytm 4 multi-mode microplate reader with hybrid technologytm. **Bio Tek Instruments**, Vermont, USA, 2008.

RAMON, G. Some historical points of immunology : the phenomenon of flocculation reaction in toxin and antitoxin mixtures, applications. **Rev. Immunol. Ther. Antimicrob.**, v. 20, p. 289-316, 1956.

REGNIER, M.; METZ, B.; TILSTRA, W.; HENDRIKSEN, C.; JISKOOT, W.; NORDE, W.; KERSTEN, G. Structural perturbation of diphtheria toxoid upon adsorption to aluminium hydroxide adjuvant. **Vaccine**, Holanda, v. 30, p. 6783-6788, 2012.

ROMMEY, M. G.; ROSCOE, D. L.; BERNARD, K.; LAI, S.; EFSTRATIOU, A.; CLARKE, A. M. Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of vancouver. **Journal of Clinical Microbiology**, Vancouver, Canada, p. 1625-1629, 2006.

RUSSEL, L. M.; HOLMES, R. K. Initial characterization of the ferric iron transport system of *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Bacteriology**, Maryland, USA, v. 155, p. 1439-1442, 1983.

SAKAUCHI, M. A. **Comparação entre as produções industriais na toxina diftérica com duas fontes de carbono no meio: glicose ou maltose**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SHARMA, H.; PATIL, V.; SHARMA, D.; KAPRE, S.; JADHAV, S.; RAVETKAR, S.; KUMAR, R.; BAHL, S.; PAREKH, S.; CHAKRAVARTY, A. A phase III, randomized controlled study to assess the safety and immunogenicity of a semi-synthetic *diphtheria*, *tetanus* and whole-cell *pertussis* vaccine in Indian infants. **Vaccine**, Pune, India, v. 30, p. 6157-6162, 2012.

SIRIPATRAWAN, U.; MAKINO, Y.; KAWAGOE, Y.; OSHITA, S. Near infrared spectroscopy integrated with chemometrics for rapid detection of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* K12. **Sensors and Actuators**, Tokyo, Japan, v. 148, p. 366-370, 2010.

SOTO, A.; ZAPARDIEL, J.; SORIANO, F. Evaluation of API coryne system for identifying coryneforms bacteria. **J. Clin. Pathol.**, Madrid, Spain, v. 47, p. 756-759, 1994.

STAINER, D. W.; CORKIL, J. M. C.; SCHOLTE, M. J. Preparation and properties of diphtheria toxoids in submerged culture. III Development of a new semi synthetic medium. **Can. J. Microbiol.**, v. 14, p. 115-1169, 1968.

SUNDARAN, B.; PALANIAPPAN, C.; RAO, Y. U. B.; BOOPATHY, R.; BHAI, L. N. R. tangencial flow filtration technology applicable to large scale recovery of diphtheria toxin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Tamil Nadu, India, v. 94, p. 93-98, 2002.

SUNDARAN, B.; RAO, Y. U. B.; BOOPATHY, R. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Tamil Nadu, India, v. 91, p. 123-128, 2001.

TAI, S. S.; KRAFFT, A. E.; NOOTHETI, P.; HOLMES, R. K. Coordinate regulation of siderophore and diphtheria toxin production by iron in *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbial Pathogenesis**, Bethesda, Maryland, USA, v. 9, p. 267-273, 1990.

TCHORBANOV, A. I.; DIMITROV, J. D.; VASSILEV, T. L. Optimization of casein-base semisynthetic medium for growing of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in a fermenter. **Can. J. Microbiol.**, Sofia, Bulgaria, v. 50, p. 821-826, 2004.

THIBAUDEAU, C.; FLANDROIS, G.; PITEUX, E.; AUFRAY, F.; MARTIN, S.; SIMON, P.; LAVIRON, B.; DUVIEU, N.; MORINEAU, C.; LEAUTE, A. G.; DEHAUT, F.; DERENNE, S. Optimization d'un processus de congélation des cellules souches hématopoïétique par l'application d'un protocole de qualification d'un congélateur programmable. **Transfusion Clinique et Biologique**, France, v. 18, p. 542-552, 2011.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4th ed., Rio de Janeiro, RJ, 2004.

UCHIDA, T.; GILL, D. M.; PAPPENHEIMER, JR. A. M. Mutation in the structure gene for diphtheria toxin carried by temperate phage. **Nat. New Biol.**, v. 35, p. 8-11, 1971.

WAGNER, K. S.; STICKINGS, P.; WHITE, J. M.; NEAL, S.; CROWCROFT, N. S.; SESARDIC, D.; EFSTRATIOU, A. A review of the international issues surrounding the availability and demand for diphtheria antitoxin for therapeutic use. **Vaccine**, London, UK, v. 28, p. 14-20, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Supplementary Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP): validation**. Geneva, 2005.

ZHONG, J. J. Bioreactor engineering. **Engineering Fundamentals of Biotechnology**, Shanghai, China, v. 2, p. 165-177, 2011.