

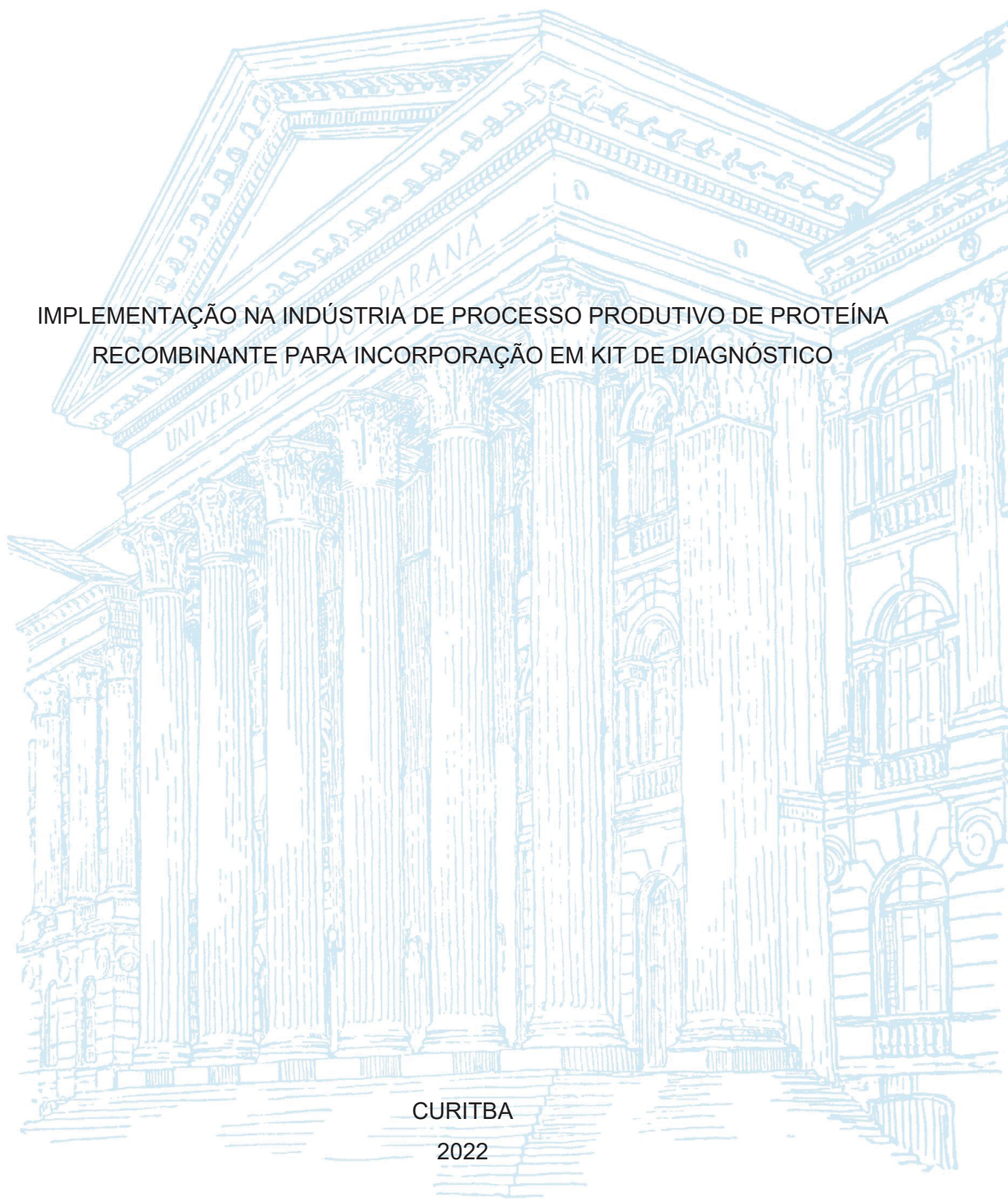
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA ZANETTE DE SOUZA

IMPLEMENTAÇÃO NA INDÚSTRIA DE PROCESSO PRODUTIVO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE PARA INCORPORAÇÃO EM KIT DE DIAGNÓSTICO

CURITIBA

2022



PRISCILA ZANETTE DE SOUZA

IMPLEMENTAÇÃO NA INDÚSTRIA DE PROCESSO PRODUTIVO DE PROTEÍNA
RECOMBINANTE PARA INCORPORAÇÃO EM KIT DE DIAGNÓSTICO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

Coorientador: Dra. Viviane Monteiro Góes

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Souza, Priscila Zanette de

Implementação na indústria de processo produtivo de proteína recombinante para incorporação em kit de diagnóstico. / Priscila Zanette de Souza. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

Coorientadora: Dra. Viviane Monteiro Góes

1. Proteínas. 2. Produção. 3. Nacionalização. 5. Custos. I. Krieger, Marco Aurélio. II. Góes, Viviane Monteiro. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016/08P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de PRISCILA ZANETTE DE SOUZA intitulada: IMPLEMENTAÇÃO NA INDÚSTRIA DE PROCESSO PRODUTIVO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE PARA INCORPORAÇÃO EM KIT DE DIAGNÓSTICO, sob orientação do Prof. Dr. MARCO AURÉLIO KRJEGER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Junho de 2022.

MARCO AURÉLIO KRJEGER
Presidente da Banca Examinadora

MONICA VESNESKI ALCANTARA
Avaliador Externo (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ)

LILIAN DIAS NASCIMENTO
Avaliador Externo (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ)

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao meu combustível diário de vida, minha maior conquista. Com todo amor
para você, meu filho Henrique.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me mostrar as oportunidades por onde trilhei meu caminho até aqui, Deus foi o responsável por colocar todas essas pessoas carinhosamente e cuidadosamente na minha vida.

Em especial, ao Dr. Marco Aurélio Krieger por me dar a oportunidade de tê-lo como orientador, e horas dedicadas a este trabalho tão desafiador de nacionalização de insumos.

A minha coorientadora, Dra. Viviane Monteiro Góes, por toda paciência, compreensão e dedicação, inclusive os “puxões de orelha”, pelo total apoio em solucionar as dúvidas e também pelas críticas e opiniões sinceras, uma amiga para toda a vida.

Aos meus pais, Milton e Paulina, que não mediram esforços e sempre primaram pela minha educação. A minha irmã Heloisa que tanto me ouviu em momentos complicados, e sempre esteve ao meu lado, mesmo que distante, me amparando.

Ao meu marido Rafael, companheiro de todos os dias desde 2008, uma pessoa de coração aberto que me incentivou em todos os passos de minha carreira científica, um pai exemplar, que também luta incessantemente para trilhar os caminhos de nosso bem mais precioso, Henrique.

Ao Henrique que incansavelmente buscou invadir meu escritório, mas que foi vencido por uma chave neste período, minhas sinceras desculpas. O meu amor por você é infinito.

Não posso deixar de agradecer ao IBMP por ter me proporcionado uma experiência de trabalho ímpar que fez com que eu me apaixonasse ainda mais pela produção de insumos para a Saúde.

Aos meus colegas do Setor de Produção que me ajudaram a realizar o trabalho diário, e em especial a Mariely, Karine e Ueriton que estiveram ao meu lado no dia a dia enfrentado vários obstáculos e também em todos os momentos de descontração.

Aos meus atuais gestores Maykon e Wesley que têm sido importantes no meu aperfeiçoamento profissional e a equipe da Engenharia e em especial ao Eric.

Além disso, a todos os colegas do IBMP que com sorrisos sinceros sempre buscaram me apoiar e quando necessário compartilharam seu conhecimento para o desenvolvimento dessa tese.

Aos membros da banca pela disponibilidade de ler e avaliar o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR por me aceitar como aluna de doutorado. Em especial aos professores, pelos ensinamentos transferidos ao longo dos anos.

Agradeço a toda minha família, que sempre me apoiou em todo meu caminho, um agradecimento muito especial aos meus padrinhos Terezinha e Valter que se fizeram presente em toda minha jornada acadêmica e deram suporte e incentivo diário que me ajudaram a não desistir de alcançar os meus sonhos.

Para todas as pessoas que citei os meus sinceros agradecimentos de coração por fazerem parte de minha vida.

É na experiência da vida que o homem evolui.

(Harvey Spencer Lewis)

RESUMO

A doença de Chagas continua acometendo entre 6-7 milhões de pessoas ao redor do mundo, dentre os indivíduos infectados cerca de 25% vivem no Brasil. Os infectados estão fortemente ligados a situações de pobreza e dependem do Sistema Único do Saúde (SUS) para o diagnóstico e manutenção da qualidade de vida. Atualmente os testes diagnósticos disponíveis no país na maior parte utilizam insumos não nacionalizados, encarecendo a cadeia produtiva. Desta forma, o objetivo do trabalho foi implementar em ambiente industrial a produção de quimeras em larga escala para uso no desenvolvimento e produção de kit diagnóstico para Doença de Chagas. O processo de escalonamento foi implementado seguindo as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e RDC nº 665 de 30 de março de 2022. Para expressão de duas proteínas quiméricas de regiões antigênicas do parasita, foram realizados processos de cultivo celular de *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) líquido em biorreator tipo onda. O processo de purificação ocorreu através de cromatografia líquida com a aplicação das técnicas de afinidade e troca iônica. As proteínas produzidas já apresentavam alta sensibilidade e especificidade em testes imunodiagnósticos descritos na literatura, entretanto, o processo se restringia a escala de bancada. Devido o avanço de demanda do mercado pelos insumos produzidos, o aumento de escala e sua produção em área com certificação foi imprescindível para consolidação da nacionalização dos insumos e redução dos custos. A consolidação de nosso principal objetivo industrial foi alcançada ao modificar o meio de cultura e volume de crescimento celular, que proporcionaram um rendimento maior que 20 mg de proteína por litro de cultivo para ambos os antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4.

Palavras-chave: 1. Quimera 2. Proteína 3. Produção 4. Nacionalização 5. Custo

ABSTRACT

Chagas disease continues affecting between 6-7 million people around the world, among the infected individuals around 25% live in Brazil. The infected individuals are strongly linked to situations of poverty and depend on the Unified Health System (SUS) for diagnosis and maintenance of quality of life. Currently, the diagnostic tests available in the country mostly use not nationalized inputs, making the production chain more expensive. Thus, the objective of this work was to implement in an industrial environment the large-scale production of chimeras for use in the development and production of diagnostic kits for Chagas disease. The scale-up process was implemented following the standards of Good Manufacturing Practices and RDC N° 665 of March 30, 2022. For expression of two chimeric proteins of antigenic regions of the parasite, cell culture processes of *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) liquid in wave bioreactor were performed. The purification process occurred by liquid chromatography with the application of affinity and ion exchange techniques. The proteins produced already presented high sensitivity and specificity in immunodiagnostic tests described in the literature, however, the process was restricted to the bench scale. Due to the advancement of market demand for the produced inputs, the scale-up and its production in certified area was essential for the consolidation of the nationalization of inputs and cost reduction. The consolidation of our main industrial goal was achieved by modifying the culture medium and cell growth volume, which provided a yield greater than 20 mg of protein per liter of culture for both IBMP-8.1 and IBMP-8.4 antigens.

Keywords: 1. Chimera 2. Protein 3. Production 4. Nationalization 5. Costs

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	22
FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	27
FIGURA 3 - CASSETE DE DIÁLISE	45
FIGURA 4 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO PLASMÍDEO	52
FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 e IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 5 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE.....	54
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 E IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 10 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE.....	54
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 E IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 25 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE.....	55
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5ML PROTEÍNA IBMP-8.1	58
FIGURA 9 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HISTRAP HP.....	59
Figura 10 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA COM COLUNA HITRAP SP HP PROTEÍNA IBMP-8.1	61
Figura 11 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HITRAP SP HP	62
Figura 12 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5ML PROTEÍNA IBMP-8.4	63
Figura 13 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HISTRAP HP.....	64
Figura 14 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HITRAP HEPARINA HP 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4.....	65
Figura 15 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP – GEL 1.....	66
Figura 16 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP – GEL 2.....	66

Figura 17 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5 ML + 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.1 MEIO DE CULTURA 2XYT	72
Figura 18 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HISTRAP HP	73
Figura 19 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA COM COLUNA HITRAP SP HP 5ML PROTEÍNA IBMP-8.1	74
Figura 20 -ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HITRAP SP HP	75
Figura 21 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5 ML + 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4 MEIO DE CULTURA 2XYT	76
Figura 22 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HISTRAP HP	77
Figura 23 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HITRAP HEPARINA HP 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4.....	78
Figura 24 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP	79
Figura 25 – RESULTADO <i>WESTERN BLOT</i> PROTEINAS IBMP-8.4 E IBMP-8.1 OBTIDAS E PURIFICADAS A PARTIR DE CULTIVO DE <i>E. COLI</i> EM 25L COM MEIO 2XYT.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -RENDIMENTO DE PROTEINA PURIFICADA DE ACORDO VOLUME DE CULTIVO NO BIORREATOR WAVE	67
Gráfico 2 - RENDIMENTO DE PROTEINA PURIFICADA DE ACORDO VOLUME DE CULTIVO NO BIORREATOR WAVE	71

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -USO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DOENÇA DE CHAGAS	26
QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS BÁSICAS PARA REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO	33
QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES IBMP	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROJEÇÃO RELATIVA ÀS ESTIMATIVAS DO NÚMERO DE PESSOAS INFECTADAS POR <i>T. CRUZI</i>	23
TABELA 2 - RENDIMENTO DE BIOMASSA ÚMIDA EM DIFERENTES VOLUMES DE CULTIVO CELULAR	56
Tabela 3 - RENDIMENTO DE MASSA ÚMIDA DE <i>E. COLI</i> DE CULTIVO CELULAR REALIZADO EM BIORREATOR WAVE COM VOLUME DE 25 L	71

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2xYT	- Meio de cultura na concentração de 2 X Extrato de Levedura e Triptona
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
ACCI	- Enzima de restrição isolada de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AEQ	- Avaliação Externa de Qualidade
Ag	- Antígeno
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHK	- Células Baby Hamster Kidney
BL21 Star (DE3)	- Linhagem de <i>Escherichia coli</i> competente usada para expressão de proteínas recombinantes
BamHI	- Enzima de restrição do tipo II isolada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BPF	- Boas Práticas de Fabricação
°C	- Grau Celsius
C-terminal	- Carboxi-terminal
CHO	- Célula Chinese Hamster Ovary
CLIA	- Chemiluminescent assays (imunoensaio quimioluminescente)
CV	- <i>Column Volume</i> (Volume de coluna)
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DO	- Densidade Óptica
DO ₆₀₀	- Densidade Óptica comprimento de onda 600nm
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EcoRI	- Enzima de restrição isolada de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	- Ácido etileno diamino tetra-acético
EIA	- Enzyme immunoassay (ensaio imunoenzimático)
ELISA	- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
g	- Grama
HAI	- <i>Indirect hemagglutination assay</i> (Teste de hemaglutinação indireta)
HCl	- Ácido Clorídrico
HindIII	- Enzima de restrição do tipo III isolada de <i>Haemophilus influenzae</i>
HP	- High Performance (Alto desempenho)

IBMP	- Instituto de Biologia Molecular do Paraná
IFA	- <i>Immunofluorescence</i> assay (Teste de imunofluorescência)
IFI	- <i>Indirect immunofluorescence</i> (Teste de imunofluorescência indireta)
IgG	- Imunoglobulina do tipo G
IgM	- Imunoglobulina do tipo M
IMAC	- Immobilized Metal Affinity Chromatography
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPTG	- Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	- Quilodalton
kLa	- Coeficiente volumétrico de transferência de gás-líquido
L	- Litro
LB	- Luria-Bertani
M	- Molar
mA	- Miliampere
mg	- Miligrama
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
MOPS	- Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
NaCl	- Cloreto de sódio
NC	- Não conformidade
NcoI	- Enzima de restrição isolada de <i>Nocardia corallina</i>
ng	- Nanograma
nM	- Nanomolar
nm	- Nanômetros
OMS	- Organização Mundial da Saúde
p/v	- Peso/volume
pb	- Pares de base
PBS	- Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	- Reação em cadeia pela polimerase
PEG	- Polietileno glicol
pET	- Plasmídeo para expressão pela T7 RNAPolimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PMSF	- <i>Phenyl methane sulphonyl fluoride</i>

Psi	- (<i>Pound force per square inch</i>) Libra força por polegada quadrada
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	- Ácido ribonucléico
RNase	- Ribonuclease
rpm	- Rotações por minuto
SDS	- Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SE	- SoftExpert Suite
SP	- Sulfopropil
SUS	- Sistema Único de Saúde
<i>T. cruzi</i>	- <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	- Tri hidroximetil aminometano
U	- Unidade de atividade enzimática
UV	- Ultravioleta
UV-vis	- Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível
V	- Volts
v/v	- Volume/volume
WB	- <i>Western blotting</i>
x g (RCF)	- <i>Relative centrifugal force</i> (força centrífuga relativa)

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

™ – Trademark symbol

° - Grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	20
2.2 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS	23
2.3 INDÚSTRIA DA BIOTECNOLOGIA	29
2.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO	31
2.5 INDÚSTRIA DE REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO	32
2.6 PROTEÍNAS RECOMBINANTES	35
2.7 ANTÍGENOS IBMP	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 ELABORAÇÃO DE DOCUMENTOS	40
3.2 TRANSFORMAÇÃO CELULAR BL21 STAR (DE3).....	40
3.3 MULTIPLICAÇÃO DO PLASMÍDEO	40
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PLASMÍDEO	41
3.5 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	41
3.6 ELETROFORESE	41
3.6.1 Gel de agarose	41
3.6.2 Gel de poliacrilamida	41
3.7 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO.....	42
3.8 PREPARO DO INÓCULO	42
3.9 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR	42
3.9.1 Avaliação de volume da batelada.....	42
3.9.2 Avaliação do meio de cultura	43
3.10 COLETA DA BIOMASSA	43
3.11 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	43
3.12 LISE CELULAR	44
3.13 CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO CELULAR	44
3.14 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE IBMP- 8.1	44

3.14.1 Cromatografia de afinidade His Trap.....	44
3.14.2 Diálise para troca de tampão.....	45
3.14.3 Cromatografia de troca iônica	46
3.14.4 Quantificação proteína IBMP 8-1	46
3.14.5 Diálise da condição estoque.....	46
3.15 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE IBMP-8.4	47
3.15.1 Cromatografia de afinidade His Trap.....	47
3.15.2 Diálise para troca de tampão.....	47
3.15.3 Cromatografia de afinidade HiTrap Heparina HP	47
3.15.4 Quantificação proteína IBMP 8-4	48
3.15.5 Diálise da condição estoque.....	48
3.16 DILUIÇÃO E ENVASE DO PRODUTO	48
3.17 <i>WESTERN BLOT</i>	49
3.17.1 Eletroforese	49
3.17.2 Transferência para membrana de nitrocelulose	49
3.18 ENCERRAMENTO DO LOTE PRODUTIVO	49
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 ELABORAÇÃO DE DOCUMENTAÇÃO	51
4.2 MULTIPLICAÇÃO DO PLASMÍDEO	52
4.3 AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE VOLUME	53
4.4 AVALIAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	70
4.5 FINALIZAÇÃO DE PRODUÇÃO	80
4.6 <i>WESTERN BLOT</i>	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO 1 – RDC Nº 665 DE 30 DE MARÇO DE 2022.....	91

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas, conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e ainda acomete entre 6-7 milhões de pessoas ao redor do mundo.

A descoberta da doença ocorreu em Minas Gerais, Brasil, em 1909 por Carlos Chagas, um dos mais importantes sanitaristas da nossa história. Mesmo após mais de 100 anos da descoberta, a doença continua endêmica na região da América Latina em pelo menos 21 países e cerca de 25% dos infectados se concentram no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

O ciclo de vida do parasita é bastante complexo e envolve hospedeiros mamíferos e insetos hematófagos, conhecidos popularmente como “barbeiros”. A via de transmissão clássica é associada a excretas do vetor infectado durante o repasto sanguíneo liberando formas infectivas (CHAGAS, 1909).

Três formas do parasita são visualizadas durante o ciclo biológico, as epimastigotas, formas de replicação presentes no inseto vetor; as amastigotas, formas de replicação presentes nos mamíferos e as formas tripomastigotas que se denominam metacíclicas quando presentes no vetor e as sanguíneas quando presentes em hospedeiros vertebrados (CHAGAS, 1909).

Entretanto, devemos citar vias alternativas de transmissão identificadas, acidentes de laboratório, ingestão de alimentos e bebidas contaminados e a transmissão vertical. Em países onde não há a presença do vetor as vias associam-se principalmente a fenômenos migratórios, onde indivíduos infectados disseminam o parasita através de transplante de órgãos e sangue. As rotas alternativas de transmissão não podem ser descartadas em regiões endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2020).

Os países endêmicos aplicam protocolos sanitários, mas a implementação de métodos de diagnóstico ainda continua difícil por conta de restrições financeiras e pesquisas sobre a doença que é considerada negligenciada (ABRAS et al., 2022; MONTALTI, 2020). O diagnóstico depende da fase da doença por conta da parasitemia. Para identificação da fase crônica da doença, os principais testes realizados baseiam na interação antígeno-anticorpo onde as técnicas aplicadas são

a imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA) devido esta etapa apresentar alto nível de imunoglobulinas anti-*T. cruzi*.

Entretanto, é imprescindível ressaltar que o protozoário possui elevado polimorfismo intraespecífico (TIBAYRENC, 2003), por esse motivo o Ministério da Saúde Brasileiro recomenda que o diagnóstico seja realizado conforme o protocolo preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), utilizando duas técnicas diferentes ou então executando dois testes com o mesmo princípio metodológico, porém com matrizes antigênicas distintas, visto que grande parte dos ensaios possuem limitações (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016a; SANTOS, 2016; SILVA et al., 2020).

A introdução da tecnologia do DNA recombinante é um fato ímpar em diversas áreas especialmente, na área de saúde. A técnica permite a união ou combinação de dois fragmentos genéticos de organismos diferentes desde a replicação até a expressão de proteínas. Dessa forma viabiliza a expressão de proteínas heterólogas que podem ser aplicadas em processos de produção de vacinas, medicamentos e testes diagnósticos. (ARAUJO, 2014; BELLÃO, 2006; DEMAIN; VAISHNAV, 2009; LEHNINGER; NELSON, 2014).

O uso de proteínas multiepítopos, expressando vários determinantes antigênicos, proporcionou o aumento expressivo na sensibilidade de testes diagnósticos. Distinguindo-se assim dos eventos de expressão realizados no passado, onde normalmente apenas um antígeno era utilizado em modelos de produção pouco apurados. Além disso, as proteínas multiepítopos simplificam todo o procedimento de padronização, reduzindo as etapas de purificação e imobilização, ressaltando que há equilíbrio no número de epítopos na superfície do imunoensaio em processo de produção (CAMUSSONE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2022; SANTOS, 2016; SANTOS et al., 2016).

Um tipo de vetor comumente utilizado na expressão de proteínas recombinantes em larga escala a partir de cultivo de *E. coli* são os plasmídeos da série pET (“plasmídeo para expressão pela T7 RNAPolimerase”). Os plasmídeos também podem simplificar a etapa de purificação da proteína quando se opta pela seleção da quimera através da calda de poli-histidinas adicionada pelo plasmídeo a proteína de interesse. A histidina possui afinidade ao níquel imobilizado na resina de colunas cromatográficas (CYTIVA, 2021a; ROSANO; CECCARELLI, 2014a). Tipicamente a célula utilizada como hospedeira para os plasmídeos pET é a *E. coli*

BL21(DE3) devido sua capacidade de produzir polimerase T7 e deficiência em proteases (FELICIANO, 2009; RATELADE et al., 2009).

A facilidade e velocidade de crescimento, o vasto conhecimento acumulado, a genética bem caracterizada e o grande número de ferramentas para expressão gênica fazem da *Escherichia coli* o organismo de escolha para a superprodução de proteínas.

Os investimentos na produção de proteínas recombinantes em larga escala no Brasil contribuíram não só para o desenvolvimento econômico do país, mas também para definição de políticas públicas para a indústria de saúde e consolidação da inovação, acarretando na melhora da qualidade de vida da população. (REIS; PIERONI; SOUZA, 2010).

É significativa a necessidade de um teste que permita o diagnóstico da Doença de Chagas de maneira precisa e rápida reduzindo as limitações apresentadas pelos métodos citados é notória e de vasta importância. Este aprimoramento deve estar baseado em características que possibilitem o reconhecimento de cepas de diferentes regiões geográficas, a redução de reações falso-negativas e na redução de reações cruzadas com organismos filogeneticamente próximos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A saúde tem significativa importância na geração, no uso e na difusão de inovação sendo essencial na atual dinâmica do desenvolvimento e competitividade mundial (GADELHA, 2012).

O desenvolvimento de produtos biotecnológicos nacionais é promissor e necessário, uma vez que, o déficit do setor aumentou em torno de 15 vezes nos últimos 20 anos. A insuficiência de informações sobre o diagnóstico *in vitro* somada a elevada dependência do mercado internacional, limitam a competitividade do país no setor frente as respostas sanitárias da população, principalmente quando tratamos de assuntos diretamente ligados a doenças tropicais negligenciadas (DAVI, 2015; GADELHA, 2012)(PAIVA, 2009).

No contexto citado acima encontram-se os indivíduos portadores da tripanossomíase americana, onde grande parte da população afetada pela doença encontra-se em situação de intensa vulnerabilidade social e econômica.

Após identificar o nicho de produção de proteínas multiepítopos recombinantes em larga escala e sua aplicação em testes rápidos. Estima-se que a aplicação dessas tecnologias permitirá a implementação de ações preventivas ágeis, seguras, de baixo custo e confiáveis em áreas de alto risco para o ressurgimento da doença de Chagas, além de viabilizar a implantação de novos protocolos de atenção e tratamento ao paciente chagásico. É necessário ressaltar que a utilização de proteínas recombinantes quiméricas, simplifica todo o processo produtivo agilizando a etapa de purificação, reduz o tempo de trabalho, reduz significativamente os custos de produção e proporciona aumento na qualidade do ensaio gerado com insumos nacionais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo implementar a produção de quimeras em larga escala para uso no desenvolvimento e produção kit diagnóstico para doença de Chagas.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar a expressão das proteínas recombinantes em *E. Coli* em escala industrial.
- Confirmar a funcionalidade das proteínas produzidas.
- Implementar o processo produtivo atendendo as Boas Práticas de Fabricação na planta de produção do IBMP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado cujo ciclo de vida inclui a passagem obrigatória por hospedeiros mamíferos, para os quais são transmitidos através do vetor hematófago, triatomíneos, conhecido pelo nome popular de “barbeiro” (ARGOLO et al., 2008; CHAGAS, 1909).

Endêmica em 21 países das Américas afetando principalmente pessoas financeiramente vulneráveis estima-se que aproximadamente 6-7 milhões de indivíduos estejam acometidos pela doença de Chagas no mundo com pelo menos 14000 mortes/ano. O número elevado de infectados mundialmente relaciona-se fortemente com reduzido investimento em diagnóstico, baixo uso de tecnologias e limitada voz política dos acometidos. Essa doença é bastante importante para o cenário nacional, uma vez que, cerca de 25% dos portadores vivem neste país continental porém, trata-se de uma doença negligenciada (HERAZO et al., 2022; MONTALTI, 2020; SANTOS et al., 2017a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). As doenças negligenciadas são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda. Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (MONTALTI, 2020; VALVERDE, 2022).

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez, em 1909, pelo brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Carlos Chagas) na cidade de Lassance, Minas Gerais durante o trabalho no combate à epidemia de malária em trabalhadores da Ferrovia Central do Brasil.

O sanitarista foi informado da existência de um inseto hematófago, popularmente chamado barbeiro. Que estava presente nos domicílios, picando o homem à noite e se escondendo em frestas das paredes e coberturas das casas durante o dia. Essas observações acentuaram a curiosidade científica do pesquisador que encontrou protozoários flagelados no intestino médio do barbeiro (CHAGAS, 1909; SANTOS, 2016).

A identificação do parasita em humanos ocorreu quando Chagas detectou o protozoário em uma criança de 02 anos. Este fato foi considerado um marco na história da medicina devido a descrição simultânea do vetor (inseto do gênero *Triatoma*), do agente etiológico da doença (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e sua patologia (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2020).

Existem outras vias, de transmissão relacionadas a transfusões sanguíneas, via oral, transplante de órgãos, via transplacentária, acidentes de laboratório, manipulação de animais infectantes.

O ciclo da doença em animais silvestres permanece com muitas dúvidas, devido à complexidade dos inúmeros hospedeiros e vetores envolvidos. Nesses ciclos participam mais de duzentas espécies entre hospedeiros e vetores. Já o ciclo doméstico é bem delineado e desse participam humanos, triatomíneos domiciliares infectados e animais sinantrópicos. (ARGOLO et al., 2008; MASSARO; REZENDE; CAMARGO, 2008).

Os barbeiros infestam principalmente as casas das regiões rurais devido ao tipo de estrutura, as casas de taipa (barro batido) e com telhados feitos de folhas de palma ou de piaçava ainda são muito comuns. Essas edificações normalmente apresentam frestas e são mal iluminadas. Além disso, em regiões rurais a lenha continua sendo uma das maneiras comuns para fazer fogo e assim, o barbeiro pode ser transportado para dentro das residências escondido entre os pedaços de madeira (ARGOLO et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2020; SANTOS, 2016).

O ciclo biológico do *T. cruzi* está representado na Figura 1, sendo bastante complexo, com o parasita se apresentando sob diferentes formas nos hospedeiros invertebrados (barbeiros) e nos hospedeiros vertebrados (mamíferos, inclusive homem). Durante o ciclo de vida observa-se diferenças morfológicas onde as tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas apresentam-se como formas infectivas clássicas e não replicativas e as epimastigotas e amastigotas como formas proliferativas (CHAGAS, 1909).

TABELA 1 - PROJEÇÃO RELATIVA ÀS ESTIMATIVAS DO NÚMERO DE PESSOAS INFECTADAS POR *T. CRUZI*

Ano	Estimativa da população brasileira	Faixa etária de referência			Estimativa do número de pessoas infectadas		Estimativa de casos com a forma digestiva		Estimativa de casos com a forma cardíaca	
		Faixa etária	População	%	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b	Infecção 1,02% ^a	Infecção 2,4% ^b
2000	173.448.346	≥5	156.133.836	90,0	1.592.565	3.747.212	159.257	374.721	477.770	1.124.164
2005	185.150.806	≥10	150.944.641	81,5	1.539.635	3.622.671	153.964	362.267	461.891	1.086.801
2010	195.497.797	≥15	145.563.676	74,5	1.484.749	3.493.528	148.475	349.353	445.425	1.048.058
2015	204.450.649	≥20	139.901.357	68,4	1.426.994	3.357.633	142.699	335.763	428.098	1.007.290
2020	212.077.375	≥25	133.880.929	63,1	1.365.585	3.213.142	136.559	321.314	409.676	963.943
2025	218.330.014	≥30	127.334.466	58,3	1.298.812	3.056.027	129.881	305.603	389.644	916.808
2030	223.126.917	≥35	120.096.221	53,8	1.224.981	2.882.309	122.498	288.231	367.494	864.693
2035	226.438.916	≥40	112.013.898	49,5	1.142.542	2.688.334	114.254	268.833	342.763	806.500
2040	228.153.204	≥45	102.983.115	45,1	1.050.428	2.471.595	105.043	247.160	315.128	741.479
2045	228.116.279	≥50	92.984.144	40,8	948.438	2.231.619	94.844	223.162	284.531	669.486
2050	226.347.688	≥55	82.097.220	36,3	837.392	1.970.333	83.739	197.033	251.218	591.100
2055	222.975.532	≥60	70.485.475	31,6	718.952	1.691.651	71.895	169.165	215.686	507.495

Fonte: (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016b)

É esperado que ocorra o aumento do mercado global de diagnóstico, com a maior migração de pessoas que podem ter impacto em saúde pública de países endêmicos e não endêmicos. Neste sentido é importante o desenvolvimento e aplicação de técnicas que proporcionem agilidade, rapidez e eficácia nos resultados.

2.2 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

O diagnóstico da doença de Chagas não é simples, uma vez que, o parasita possui alta plasticidade genética e fenotípica intraespecífica podendo apresentar até 48% de modificação no tamanho genômico entre diferentes linhagens, fenômenos que influenciam negativamente uso de apenas uma hipótese confirmativa (LEWIS et al., 2009; RODEA et al., 2018; SILVA et al., 2020).

Na fase aguda o exame parasitológico é o mais indicado onde o critério de positividade é definido pela presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, identificadas por meio do exame direto do sangue periférico (com ou sem centrifugação prévia) com o uso de microscopia (com ou sem coloração) (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; OSTERMAYER et al., 2011).

Entretanto, é recomendada a realização simultânea de diferentes modalidades de exames parasitológicos diretos como a pesquisa a fresco de tripanossomatídeos, métodos de concentração ou lâmina corada de gota espessa ou de esfregaço. A pesquisa a fresco de tripanossomatídeos é de execução rápida e simples, sendo mais sensível que o esfregaço corado. A situação ideal é a realização da coleta com paciente febril e dentro de 30 dias do início de sintomas (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016b; OSTERMAYER et al., 2011). O exame pode ser realizado diretamente ao microscópio em uma gota de sangue entre lâmina e lamínula, e a coleta deve ser realizada simultaneamente para métodos de concentração do sangue.

Além disso, é de extrema importância destacar que em quadros suspeitos quando os resultados do exame a fresco e de concentração forem negativos na primeira coleta, devem ser realizadas novas coletas até a confirmação do caso e/ou desaparecimento dos sintomas da fase aguda, ou ainda confirmação de outra hipótese diagnóstica (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em casos mais complexos, onde não se identifica o parasita na pesquisa direta, mesmo utilizando todas as técnicas e a opção de segunda coleta existe, há a possibilidade de verificação de presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico. Entretanto esse método é considerado sugestivo da fase aguda, particularmente quando associada a contexto epidemiológico e manifestações clínicas (CAMARGO; AMATO NETO, 1974; DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001)

Para estabelecer métodos moleculares existem dificuldades, uma vez que, esses necessitam de estruturas mais avançadas e podem encarecer os exames, já que os laboratórios devem possuir toda uma cadeia montada com equipamentos específicos, esses ainda não estão na rotina. Todavia já existem estudos buscando reduzir custos com uso de novos equipamentos utilizando PCR miniaturizada e reagentes nacionais, aqui podemos ressaltar que este tipo de conduta é uma das buscas alternativas para atender regiões mais carentes do Brasil, onde está metodologia começa a ser mais empregada (RAMPAZZO et al., 2019).

Na fase crônica da doença existe parasitemia subjacente, ou seja, a visualização dos parasitas no sangue periférico é pouco viável, mesmo utilizando métodos de concentração, torna-se necessário o uso de métodos de detecção

indiretos evidenciados no aumento dos títulos de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. (SOSA-ESTANI; VIOTTI; SEGURA, 2009).

As reações baseadas em antígeno-anticorpo são uma alternativa para realização de diagnóstico em maior número de pacientes simultaneamente (GILBER, 2007). O diagnóstico através de imunoenensaio indiretos utilizam técnicas como o ensaio de ELISA, imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, testes de diagnóstico rápido, ensaios de fluxo lateral, aglutinação de partículas e imunoenensaio (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014). Porém testes sorológicos que utilizam antígenos nativos podem apresentar reações cruzadas com organismos filogeneticamente próximos. O diagnóstico de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* é necessário em diversas situações, quadro 1. (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001).

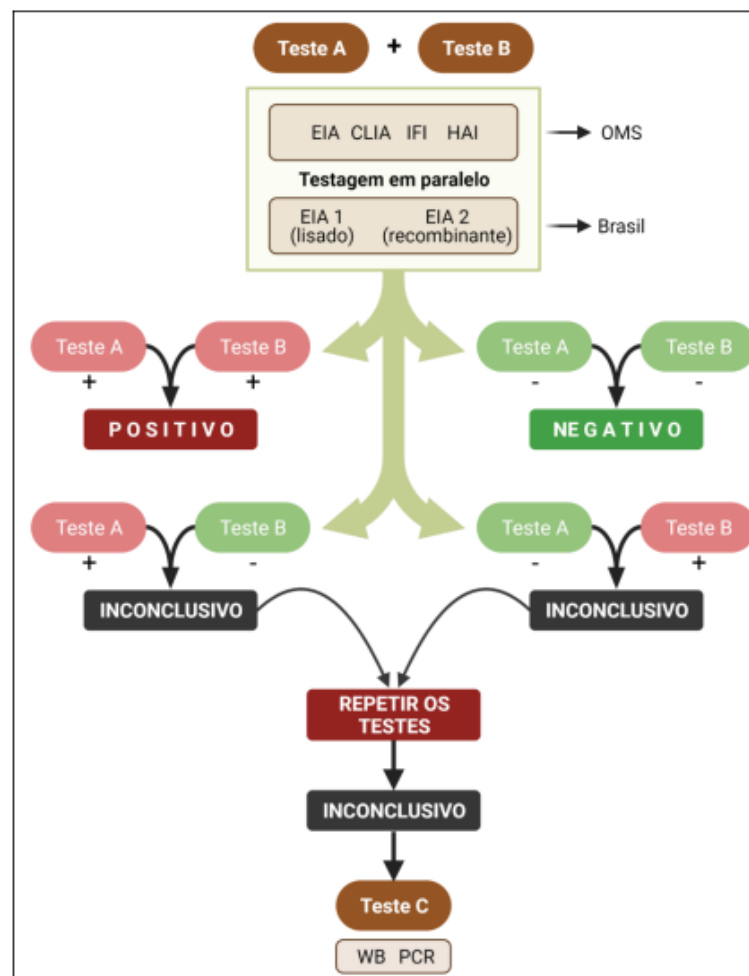
QUADRO 1 -USO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DOENÇA DE CHAGAS

Aplicação	Local de teste	Requisitos	Observações/Dificuldades
Confirmação da etiologia em um paciente	Laboratório de diagnóstico	Alta especificidade	A identificação incorreta da amostra pode gerar um laudo errado. Um resultado falso-positivo pode ter consequências graves como não aprovação em uma vaga de emprego e a preocupação psicológica de possuir uma doença grave.
Triagem das bolsas de sangue doadas	Banco de Sangue	Alta sensibilidade	Um falso-negativo pode transmitir a infecção para o receptor do sangue doado.
Trabalho epidemiológico (certificação de área livre de infecção)	Rede pública de saúde	Alta sensibilidade	Reação cruzada com Leishmaniose pode indicar falso-positivo.
Acompanhamento após tratamento etiológico	Laboratório de pesquisas (comparação com a concentração de anticorpos antes do tratamento)	Alta especificidade e sensibilidade	Necessário um longo período de observação. Armazenar amostras de soro para posterior comparação.
Check up em imunossuprimidos	Laboratório de diagnóstico	Alta especificidade	Possibilidade de reativação da infecção
Suspeita de fase aguda sem parasitas detectáveis	Laboratório de diagnóstico (ensaio com conjugados de IgM, procurando por IgM específico)	Priorizar a procura por parasitas. Se o resultado for negativo, seguir para pesquisa com IgM	Em casos positivos, deve ser tratado especificamente
Suspeita de infecção congênita	Laboratório de diagnóstico	A mãe deve ter sorologia positiva. Pesquisa de IgG específica após os seis meses de idade	Se IgG estiver presente após os seis meses de vida, a criança deve ser tratada com medicamentos tripanocidas

Fonte: Modificada de (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001) (tradução O autor)

Devido a elevada diversidade genética e fenotípica do *T. cruzi*, questões de cada método podem ser levantadas, como a escolha dos antígenos empregados, variação na prevalência da doença e respostas imunes variáveis entre os indivíduos infectados. Nesse sentido, a OMS aconselha o uso paralelo de dois testes sorológicos diferentes, incluindo um que tenha alta especificidade para o diagnóstico de tripanossomíase americana enquanto que, o Ministério da Saúde Brasileiro abre exceções possibilitando a execução de dois testes com o mesmo princípio metodológico porém, com matrizes antigênicas distintas como lisado de parasitas e proteínas recombinantes (RODRIGUES et al., 2022; SANTOS, 2016).

FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS



Legenda: CLIA: quimiluminescência; EIA: imunoabsorção enzimática IFI: imunofluorescência indireta; HAI: hemaglutinação indireta; PCR: reação em cadeia pela polimerase; WB: *Western blot*. Fonte: (DALTRO, 2021)

As técnicas de diagnóstico citadas a cima para identificação de chagásicos crônicos estão incluídas entre as abordagens mais frequentemente utilizadas, servindo para diferentes propósitos, como o uso em inquéritos epidemiológicos, nas rotinas médicas e nas investigações científicas. A partir desse quadro define-se que estes métodos devem ser cuidadosamente avaliados buscando os melhores resultados e a maneira com que devem ser interpretados, todos possuem uma particularidade, carregam a relação antígeno-anticorpo. A análise de 4.000 pacientes através de hemaglutinação, IFI, Elisa demonstrou discrepâncias nos resultados suscitando várias questões e mais uma vez confirmou a necessidade de mais de um teste ou matriz na fase crônica da doença (SOUZA; AMATO NETO, 2012).

Brasil e colaboradores apresentaram dados bastante consistentes seguindo normas previamente estabelecidas utilizando os testes comerciais presentes para detecção de doença de Chagas e deixando bastante claro a necessidade de seguir o esquema descrito na FIGURA 2. Nesse estudo as formas moleculares, como PCR também foram avaliadas (BRASIL; CASTRO; CASTRO, 2016).

A investigação utilizando várias plataformas deixou claro que mesmo existindo uma série de algoritmos para detecção da doença fica evidente que os testes sorológicos para a fase crônica se baseiam nos ensaios de ELISA nas formas convencional e/ou utilizando antígenos recombinante (BRASIL; CASTRO; CASTRO, 2016).

Os resultados encontrados para os testes sorológicos de ELISA avaliados, demonstrou a real necessidade da aplicação de dois testes simultâneos para o diagnóstico da doença de Chagas. Uma vez que ainda são identificadas provas de heterogeneidade da precisão dos testes disponíveis, ausência de dados chave nos estudos, probabilidade de precisões sobrestimadas, e talvez, a prevalência de resultados inconclusivos durante as investigações clínicas. O uso da técnica de PCR continua discutível e em aberto não se indicando que o mesmo faça parte de rotina, visto que a sensibilidade do teste é limitada pelas características do próprio parasita (BRASIL; CASTRO; CASTRO, 2016). Os protocolos padronizados apresentam restrições para implementação devido necessidade de equipe técnica altamente qualificada, armazenamento e transporte em baixa temperatura e equipamentos específicos (JUNQUEIRA, 2008; SILVA et al., 2020).

Essas características salientam a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico da infecção por *T. cruzi* voltadas a realidade do

sistema de saúde, as necessidades das populações afetadas, simples utilização e aplicação em larga escala (SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2020).

O desenvolvimento de teste rápido, surge como um método para superar essas limitações. A tecnologia viabiliza detectar casos agudos e crônicos da doença de Chagas com baixo custo, além do acompanhamento da eficácia do tratamento e evolução de pacientes transplantados (RODRIGUES et al., 2022; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014). Os testes são baseados em diferentes princípios como imunocromatografia, aglutinação de partículas, imunofiltração ou imunodot. O resultado é de fácil interpretação, rápido, não requer conhecimento e equipamento específico. Dessa forma é possível realizar o diagnóstico da doença de Chagas em localidades onde o acesso a um teste laboratorial é limitado (RODRIGUES et al., 2022; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014).

2.3 INDÚSTRIA DA BIOTECNOLOGIA

A aplicação da biotecnologia na área farmacêutica ou de diagnóstico depende de competências multidisciplinares, por vezes difíceis de reunir dentro de uma organização (REIS; PIERONI; SOUZA, 2010).

A incorporação da biotecnologia e dos produtos biológicos no portfólio das empresas nacionais é essencial para manter a competitividade. O impacto dessa incorporação não é gerado somente na esfera da inovação como em processos de desenvolvimento tecnológicos, mas também diretamente nos produtos (GADELHA, 2012; REIS; PIERONI; SOUZA, 2010).

Na indústria a simulação de diferentes cenários produtivos realizados em ambiente virtual que permitem testar, avaliar e prever os efeitos gerados é de grande interesse e proporciona redução de custos (KULKARNI, 2015). Softwares de simulação computacional como o FlexSim® permitem explorar variações nos processos de produção sem a necessidade de interromper o processo em execução. A aplicação efetiva do software fortalece a tomada de decisões para o gerenciamento de projetos, gerenciamento da cadeia de suprimentos e otimização de processos (HERING et al., 2020; KULKARNI, 2015; SARTORI et al., 2020).

Atualmente, no cenário mundial está ocorrendo de forma acelerada a quarta revolução industrial também denominada de manufatura avançada ou indústria 4.0

(LIMA; GOMES, 2020). A indústria 4.0 propõe o estabelecimento de indústrias inteligentes, baseadas em linhas de produção modulares e flexíveis onde o ambiente fabril opera sistemas de computação integrados. Dessa forma há a coleta dados que permitem monitorar e maximizar a produtividade através de modelos virtuais, otimizar processos, reduzir o tempo de atendimento, agregar maior qualidade ao produto, reduzir o índice de quebra de equipamento e parada de produção não planejadas, realizar tomadas de decisões ágeis e descentralizadas (ISPE, 2019a; SILVA; AMORIM; RESENDE, 2020).

Os produtos biotecnológicos, devido suas características biológicas, podem ser instáveis e imprevisíveis. A indústria 4.0 contribui significativamente nesses processos, uma vez que, o monitoramento contínuo de forma robusta e precisa viabiliza a detecção de alterações nos processos e permite a tomada de decisão para interrupção ou não do lote. Dessa forma, o desperdício de matéria prima, produtos intermediários, consumo de água e energia e horas trabalhadas é evitado (ISPE, 2018; MANUFACTURING CHEMIST, 2016; OZTEMEL; GURSEV, 2020; SILVA; AMORIM; RESENDE, 2020)

Um grande desafio da indústria farmacêutica e biotecnológica quanto a implementação da indústria 4.0 é em relação a segurança de dados. A quantidade de dados coletados durante a produção de lotes é impressionante, porém essas informações raramente são usadas para algo além do atendimento as exigências regulatórias (ISPE, 2018; SILVA; AMORIM; RESENDE, 2020). A indústria 4.0 promete proporcionar a coleta e análise dos dados e viabilizar a comunicação entre diferentes equipamentos e sistemas da fábrica e assim proporcionar a antecipadamente a otimização de processos e operações. A digitalização, conectará tudo, criando novos níveis de transparência e adaptabilidade para um chão de fábrica digitalizado. Para essa demanda será necessário elaborar uma arquitetura de dados e sistemas em que a integridade dos dados permitem uma trilha de auditoria automatizada e integrada, sem esquecer de atender as normas vigentes para cada tipo de produto (ISPE, 2018, 2019a; LIMA; GOMES, 2020; SILVA; AMORIM; RESENDE, 2020; STEINWANDTER; BORCHERT; HERWIG, 2019).

No setor de engenharia há dois obstáculos dominantes que precisam ser superados para transformar a coleta de dados, a transferência de dados bidirecional em tempo real e a análise de dados na fabricação de produtos para saúde. O primeiro é a desconexão entre as atividades de chão de fábrica e a tomada de

decisões em diferentes níveis da empresa. E o segundo trata sobre os diversos tipos de software executados localmente não estão em conformidade com um padrão de Internet das Coisas Industrial para a indústria farmacêutica (ISPE, 2019b).

2.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

As Boas Práticas de Fabricação correspondem a um conjunto de normas obrigatórias que estabelecem e padronizam procedimentos e conceitos de boa qualidade para produtos, processos e serviços, visando atender aos padrões mínimos estabelecidos por órgãos reguladores governamentais nacionais e internacionais, cuja incumbência é zelar pelo bem estar da comunidade.

Para alguns segmentos industriais, o controle e a gestão da qualidade estão presentes devido exigências de atendimento a normas e legislações governamentais (CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007). A implementação da BPF trata-se não somente do atendimento a legislação governamental, mas proporciona uma gestão eficaz dos recursos produtivos da empresa.

Para garantir a segurança sanitária dos produtos para a saúde são necessários três conceitos conformidade, eficácia e efetividade. Onde conformidade, trata do cumprimento das normas técnicas que se destinam ao produto para garantir a execução dos procedimentos de forma correta. A eficácia trata-se do efeito que resulta do uso do produto em condições controladas. E a efetividade é o efeito obtido quando se está utilizando o produto durante os serviços de rotina. Desta forma, entende-se que somente com estes atributos é possível garantir a segurança de um produto no mercado (ANTUNES, 2002; ZOTELLI, 2012).

Através da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), uma autarquia sob regime especial. A ANVISA foi criada com a finalidade institucional de promover a proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados (ANVISA, 2022a). A autarquia atua em estabelecer normas, propor, acompanhar e executar as políticas, as diretrizes e as ações de vigilância sanitária financeira (PIOVESAN, 2002).

Quando não há o cumprimento das normas, as empresas estão sujeitas a sanções de impacto regulatório com carta de advertência, declaração de não conformidade (NC), perda da licença de produção e comercialização, embargo comercial, recolhimento de produtos do mercado, alerta de segurança, multa e penalidades, dificuldade na aprovação de novos produtos, dentre outros (RATTAN, 2018).

Diante da necessidade fundamental de promover o aprimoramento dos sistemas nacionais voltados para a regulamentação e controle dos produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso *in vitro*, a ANVISA aprovou a RDC nº 16 de 28 de março de 2013 (ANVISA, 2013) revogada através da publicação da RDC nº 665 de 30 de março de 2022 (ANVISA, 2022b). Dessa forma, busca-se a garantia da qualidade, segurança e eficácia dos produtos comercializados no Brasil.

A garantia ao atendimento a legislação ocorre através da implementação do sistema de garantia da qualidade. Esse sistema deve assegurar que o desenvolvimento, produção, controles internos, controle de qualidade, treinamentos, definições de responsabilidades, calibração de equipamentos, validação de processos, armazenamento e manuseio de matéria-prima, sistema logístico, reclamação de cliente são realizados de forma a atender a legislação vigente. Além da necessidade de realizar auditorias interna regulares, que avaliem a efetividade e o cumprimento do sistema de garantia da qualidade (CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007; FIOCCHI; MIGUEL, 2003; MORETTO, 2002; ZOTELLI, 2012)

2.5 INDÚSTRIA DE REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO

Os reagentes para diagnóstico possuem papel importante para saúde pública, vigilância epidemiológica e serviços de hemoterapia. Caracteriza-se como reagente para diagnóstico a aplicação de reações químicas, bioquímicas, imunológicas ou biológicas, para obter resultados de apoio às avaliações clínicas em pacientes (MEDEIROS, 2004).

Há kits de diagnóstico *in vitro* em que as reações de detecção ocorrem através da interação entre antígeno e anticorpo. Os antígenos podem ser produzidos a partir de vírus, bactérias, fungos ou células. Porém para desempenhar corretamente sua função, um reagente para diagnóstico precisa apresentar algumas

características básicas, QUADRO 2, que influenciam na qualidade do produto e seus resultados (MEDEIROS, 2004).

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS BÁSICAS PARA REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO

Característica	Importância
Sensibilidade	A sensibilidade proporciona uma menor possibilidade de obtenção de resultados “falso negativos”.
Especificidade	A maior a especificidade gera menor possibilidade de obtenção de resultados “falso positivos”.
Reprodutibilidade	Apresenta características homogêneas entre diferentes lotes de produção e/ou gera resultados similares mesmo trocando os usuários.
Repetitividade	Apresentar resultados com variações mínimas e dentro faixas aceitáveis em vários ensaios em um mesmo ensaio.
Estabilidade	Maior estabilidade do produto contribui positivamente em seu prazo de validade e as condições de armazenamento.
Simplicidade	Facilita a realização e interpretação do teste pelo usuário.
Resultado Rápido	Propicia uma intervenção terapêutica mais rápida.

Fonte: Adaptado de (MEDEIROS, 2004).

O Brasil possui adversidades, como limitação na distribuição dos medicamentos e produtos da saúde ou processo moroso de desenvolvimento, que precisam ser superadas para manter o controle do déficit da balança comercial. No ano de 2011, segundo Gadelha, o déficit comercial em saúde era de US\$ 10 bilhões, o ano de 2019 elevou ainda mais esse déficit que foi de US\$ 11,2 bilhões (FERNANDES; GADELHA; MALDONADO, 2021; GADELHA, 2012). Os dados expõem a dependência do sistema nacional de saúde ao mercado externo, além de

apresentar a necessidade de desenvolver o aumento da capacidade produtiva nacional através de estratégias ativas de inovação que considerem plataformas tecnológicas baseadas nos avanços da biotecnologia, da química fina e dos produtos naturais (FERNANDES; GADELHA; MALDONADO, 2021; GADELHA, 2012).

Ao realizar a nacionalização dos reagentes para diagnóstico proporciona-se uma significativa economia aos cofres públicos. Como descrito por Medeiros, em casos em que a produção dos reagentes ocorre por empresas públicas há um compromisso majoritário de apoio as políticas de saúde pública do Brasil. As indústrias produtivas públicas, precisam manter sua sustentabilidade econômica, porém mesmo presente no competitivo mercado de reagentes para diagnóstico essas empresas possuem a compromisso social de desenvolver, produzir e fornecer produtos que atendam aos direitos garantidos pela Constituição Federal e pelas leis orgânicas da saúde. (GADELHA, 2012; MEDEIROS, 2004).

Dessa forma, é imprescindível a aplicação de práticas de gestão empresarial capazes de desenvolver estratégias que proporcionem a autossustentabilidade econômica e tecnológica, uma vez que o mercado de reagentes para diagnóstico precisa ofertar produtos de baixo valor comercial para atender demandas estratégicas de saúde pública (FERNANDES; GADELHA; MALDONADO, 2021; MEDEIROS, 2004; PAIVA, 2009).

De acordo com relatórios publicados, no ano de 2020 o mercado mundial de diagnóstico *in vitro* foi avaliado em 83,4 bilhões de dólares com taxa atual de crescimento composta estimada de 4,5% ano. O segmento de reagentes dominou o mercado de diagnóstico *in vitro* e foi responsável por 65,3%, maior fração da receita em 2020. O crescimento desse segmento pode ser atribuído à crescente demanda por dispositivos rápidos, precisos e sensíveis alinhada ao surto de COVID-19 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021; MARKET DATA FORECAST, 2022).

O mercado de reagentes para diagnósticos é extremamente afetado pelo preço dos produtos, por isso, as grandes empresas entram em intensa competição em termos de fabricação de produtos eficientes e econômicos. As maiores empresas buscam por aquisições, parcerias e fusões, a fim de fortalecer suas capacidades de fabricação, portfólio de produtos e fornecer diferenciação competitiva. Porém as movimentações estratégicas o reposicionamento competitivo, diminui significativamente as oportunidades para novos participantes no mercado.

As empresas com potencial inovador deparam-se com a dificuldade em atender aos altos requisitos de capital (FERNANDES; GADELHA; MALDONADO, 2021; GRAND VIEW RESEARCH, 2021; MARKET DATA FORECAST, 2022).

A atuação das grandes empresas ocorre de forma expressiva através do contínuo monitoramento desde a publicação de material científico até o lançamento de novas tecnologias no mercado. Para situações em que o reagente será comercializado para o setor público a principal estratégia de mercado das empresas multinacionais tem sido ofertar o sistema de comodato de equipamentos com consumo mínimo de kits mensais pelos estabelecimentos de saúde. Que devido ao poder de compra do Estado viabiliza uma forte competição de preço, suporte técnico e qualidade entre as grandes empresas para o atendimento da demanda. No entanto a competição não ocorre entre várias empresas, pois as multinacionais se especializam em setores diferentes da saúde pública (ALMEIDA, 2015; GADELHA, 2012; PAIVA, 2009).

2.6 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes além de fácil produção e purificação, apresentam também homogeneidade, elevada sensibilidade e especificidade em relação aos antígenos brutos. Ao desenvolver uma proteína recombinante é possível elaborar antígenos contendo mais de um epítipo imunodominante definido com o objetivo de melhorar o desempenho do diagnóstico (LIN; CHEN; YAN, 2008; OZTURK et al., 2022). A capacidade de expressar e purificar a proteína recombinante desejada em grande quantidade permite sua caracterização bioquímica, seu uso em processos industriais e o desenvolvimento de produtos comerciais como as vacinas, quimeras específicas para testes diagnósticos, enzimas entre outras aplicações (ROSANO; CECCARELLI, 2014b).

A engenharia genética viabilizou a produção em larga escala de forma padronizada permitindo obter grande quantidade das proteínas de interesse e dessa forma, atender a demanda das indústrias. As proteínas recombinantes podem ser expressas em culturas de células de bactérias, leveduras, mamíferos, plantas e insetos. Entretanto, é necessário considerar alguns fatores como a qualidade da proteína, funcionalidade, tempo de produção e rendimento para realizar a escolha do sistema de expressão adequado (CARMIGNOTTO; AZZONI, 2019).

A escolha da célula hospedeira traça o esboço de todo o processo de produção da proteína recombinante, uma vez que, a célula hospedeira define a tecnologia que será utilizada, a variedade de ferramentas moleculares disponíveis, os equipamentos ou reagentes necessários (ROSANO; CECCARELLI, 2014b).

Os procariontes, representados principalmente por *Escherichia coli*, eucariontes por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* e células de mamífero (CHO e BHK) são os sistemas de expressão frequentemente utilizados em produções de larga escala segundo (ARAUJO, 2014).

A *Escherichia coli* é o microrganismo que se possui o maior conhecimento genético e metabólico, por isso é a primeira escolha para expressão heteróloga. Esse sistema oferece diversas vantagens como fácil manipulação, crescimento em meio de cultivo de baixo custo, rápido acúmulo de biomassa, alto rendimento de produção, uma vez que, a proteína heteróloga pode ser acumulada em níveis acima de 50% de sua massa celular e a disponibilidade de ferramentas moleculares eficientes e processos de expressão bastante conhecidos (ARAUJO, 2014; BELLÃO, 2006; DEMAÏN, 2001).

Teoricamente, as etapas necessárias para obter uma proteína recombinante são bastante simples. Inicia-se pelo gene de interesse, é realizada a clonagem em qualquer vetor de expressão, transformação no hospedeiro de escolha, indução e, em seguida, a proteína está pronta para purificação e caracterização. No entanto, dezenas de características dentro da cadeia de produção podem afetar o resultado final como por exemplo a formação de corpos de inclusão, inatividade de proteínas ou mesmo a não obtenção de proteína de interesse (ROSANO; CECCARELLI, 2014a).

Em 1987 o primeiro plasmídeo de expressão pET foi descrito no trabalho de Rosenberg, nele o forte promotor $\phi 10$ para a T7 RNA polimerase (promotor T7) e o terminador de transcrição T ϕ (T7 terminador) foram integrados ao esqueleto pBR322 e receberam a nomenclatura pET (plasmídeo para expressão pela T7 RNA polimerase)(ROSENBERG et al., 1987). O vetor pET28a é o plasmídeo de expressão mais disseminado no mercado, seu uso está descrito em mais de 40.000 artigos já publicados. Ele possui o promotor T7 e uma sequência de operador *lac* adjacente que é incluída para suprimir a expressão não induzida (DUBENDORF; STUDIER, 1991; SHILLING et al., 2020). Em um experimento típico, a sequência de codificação a ser expressa é clonada a jusante e

em quadro com a sequência de codificação para um marcador de purificação de poli-histidina e um sítio de reconhecimento de protease de trombina de modo que a proteína recombinante produzida podem ser facilmente purificados usando protocolos padronizados (DUBENDORF; STUDIER, 1991; SHILLING et al., 2020).

Esses plasmídeos de expressão promovem altos níveis de transcrição em cepas de *Escherichia coli* que contém um fragmento de fago DE3 que codifica a RNA polimerase T7 (ROSANO; CECCARELLI, 2014a; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019; SHILLING et al., 2020)

A utilização do potencial de expressão do plasmídeo combinada com a otimização da célula competente permite procedimento de padronização das etapas de produção da proteína recombinante com custo de produção reduzido. (CAMUSSONE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2022; SANTOS, 2016; SANTOS et al., 2016)

A produção e purificação em larga escala de antígenos parasitários através da bioquímica clássica é uma tarefa bastante complexa e demorada, e o rendimento de componentes antigênicos é extremamente baixo. O uso combinado das técnicas de imun química e clonagem gênica permitiram a construção de proteínas recombinantes um reagente definido a nível molecular, com o aumento da produção e grau de pureza. Desta forma, os ensaios imunológicos apresentaram um aumento significativo na especificidade da reação, proporcionando um diagnóstico mais preciso, reduzindo o número de reações falso-positivas (DA SILVEIRA; UMEZAWA; LUQUETTI, 2001; SANTOS, 2016).

2.7 ANTÍGENOS IBMP

O Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) atua em pesquisa aplicada, desenvolvimento tecnológico, inovação e produção industrial de insumos e kits de diagnóstico para a saúde e suas entregas se destinam ao abastecimento da rede de saúde com produtos seguros e de qualidade (IBMP, 2022).

Seguindo esse objetivo, o grupo de desenvolvimento tecnológico em parceria com colaboradores desenvolveu antígenos recombinantes quiméricos denominados IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP8.3 e IBMP-8.4. Essas moléculas IBMP são constituídas por sequências escolhidas na literatura (SANTOS, 2016; ZANCHIN et

al., 2018). Os quatro antígenos são formados por sequências imunodominante, conservadas e repetitivas de diversas proteínas do *T. cruzi* (quadro 3).

QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES IBMP

IBMP	Segmentos	Denominação	Peso Molecular (kDa)
8.1	SAPA	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase	17
	RPL19	Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S	
	Ag2/B13/CA-2	Proteínas de superfície de tripomastigota	
8.2	Ag1/H49/JL7	Proteínas associadas ao citoesqueleto	36
	SAPA	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase	
	Ag2/B13/CA-2	Proteínas de superfície de tripomastigota	
8.3	Ag2/B13/CA-2	Proteínas de superfície de tripomastigota	30
	CRA/JL8/Ag30	Antígenos repetitivos citoplasmático	
	TcD	Trans-sialidase	
	RPL19	Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S	
8.4	SAPA	Antígeno de fase aguda/Trans-sialidase	45
	RPL19	Proteína L19 de subunidade ribossomal 60S	
	Ag2/B13/CA-2	Proteínas de superfície de tripomastigota	
	FRA	Proteína de antígeno repetitivo flagelar	
	MAP	Proteína associada ao microtúbulo	
	KMP-11	Proteína da membrana do cinetoplasto	

Fonte: Modificado de (SANTOS, 2016)

Estudos avaliaram as proteínas quiméricas quanto ao potencial diagnóstico em seres humanos, características moleculares como estabilidade, estado de agregação em diferentes condições de temperatura, força iônica e composição de estrutura secundária (CELEDON et al., 2021; SANTOS, 2016). Os antígenos foram padronizados para diagnóstico sorológico, em humanos, em estudos de fase I, II e III (APARECIDA et al., 2020; DALTRO, 2021; DEL-REI et al., 2019; DOPICO et al., 2019; LIA et al., 2022; SANTOS et al., 2016, 2017a), além de avaliados na fase I para ensaio de fluxo lateral (SILVA et al., 2020) e detecção da doença de Chagas em cães (LEONY, 2019).

Os quatro antígenos apresentaram excelentes resultados quando utilizados nas técnicas de ELISA, microarranjo líquido e Western blot na fase I (DALTRO, 2021; LEONY, 2019; SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2020). Diante dos resultados obtidos todas as moléculas são elegíveis para compor o estudo de fase II. A segunda etapa tem como objetivo a determinação dos parâmetros de desempenho (sensibilidade, especificidade e acurácia) para um quantitativo amostral

estatisticamente calculado usando amostras representativas do agravo. (SANTOS et al., 2017a), em estudo de fase II, utilizando o diagnóstico da doença de Chagas através de ELISA onde se observou que as proteínas IBMP-8.1, IBMP-8.2, IBMP-8.3 e IBMP-8.4 apresentaram sensibilidade de 97,4%, 94,3%, 97,9% e 99,3% e especificidade de 99,4%, 99,6%, 99,9% e 100%, respectivamente. Os ensaios utilizaram amostras oriundas de diversos estados brasileiros, bem como de painéis comerciais internacionais. O desempenho alcançado foi maior que testes disponíveis para comercialização no Brasil. Os resultados encontrados com o microarranjo líquido foram semelhantes aqueles encontrados no ELISA (SANTOS et al., 2017b).

As quimeras foram avaliadas para diagnóstico de amostras séricas humanas de indivíduos de outros países, áreas endêmicas (América) e não endêmicas (Europa), com o objetivo de analisar o desempenho destas moléculas em *T. cruzi* de diferentes cepas e pacientes negativos. Para essas análises, foram utilizadas as moléculas IBMP-8.1 e IBMP-8.4, já que ambas apresentaram os maiores valores de acurácia dentre as quatro, quando aplicada a técnica de imunocromatografia de duplo percurso. Em ambas as situações, o desempenho diagnóstico dos antígenos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 manteve-se elevado, sendo, inclusive, semelhante ao reportado em estudos prévios (fase II) conduzidos no Brasil (DEL-REI et al., 2019; DOPICO et al., 2019; SANTOS et al., 2017a, 2017b; SILVA et al., 2020).

Daltro de colaboradores, identificaram baixos índices de reatividade cruzada para os antígenos IBMP 8.1, IBMP 8.2, IBMP 8.3 e IBMP 8.4, ao avaliar amostras séricas de humanos que vivem em áreas de co-endemicidade com espécies do gênero *Leishmania spp.* Os resultados indicam que independentemente da origem geográfica ou apresentação clínica, os soros com anticorpos de *T. cruzi* são diagnosticados quando há o uso dos antígenos quiméricos IBMP-8.1 e IBMP-8.4 (DALTRO et al., 2019; SILVA et al., 2020). A demanda das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foi consolidada a partir do registro na ANVISA do kit diagnóstico de teste rápido denominado TR Chagas BIO-MANGUINHOS, sob numeração 80142170043 encontrando-se ativo até 2030 (ANVISA, 2022c) que utiliza as proteínas quiméricas como insumo de produção. Diante de resultados promissores em desenvolvimento e surgimento de demanda do produto no mercado nacional, esse trabalho trata da produção das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 em maior escala e sua implementação na indústria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ELABORAÇÃO DE DOCUMENTOS

A produção e purificação das proteínas recombinantes foram realizadas na planta de produção do IBMP que possui certificação e opera em BPF atendendo a RDC n° 665 de março de 2022.

Para atender as exigências da norma e de todo Sistema de Gestão da Qualidade do IBMP, foram elaborados documentos para cada etapa do processo que ficam armazenados no software SE (SoftExpert Suite), sistema de gestão de documentos utilizados pela empresa.

3.2 TRANSFORMAÇÃO CELULAR BL21 STAR (DE3)

Alíquotas de célula competente BL21 Star (DE3) foram transferidas do ultrafreezer para banho de gelo até o descongelamento. Em seguida DNA plasmidial circular foi adicionado e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. A mistura de célula e DNA plasmidial foi exposta a 42 °C por 2 minutos e retornada ao banho de gelo por 3 minutos. Um mililitro de meio de cultura foi adicionado ao tubo e então as células foram submetidas a incubação por 1 hora, a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. Por fim, as células foram espalhadas em placa de Petri com meio de cultura LB-ágar suplementado com sulfato de canamicina (50 µg/ml) e incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.3 MULTIPLICAÇÃO DO PLASMÍDEO

Para multiplicação do plasmídeo pET28a contendo o gene de interesse, foi realizada a transformação celular utilizando a célula competente BL21 Star (DE3) conforme descrito no item anterior. A extração plasmidial foi realizada utilizando o kit comercial Gene Jet conforme o protocolo descrito no manual do produto (THERME SCIENTIFIC, 2014).

Após a determinação da concentração foi realizado ajuste de concentração para 100 ng/µL de DNA plasmidial.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PLASMÍDEO

A concentração de plasmídeo foi determinada utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific®), através da medida densidade óptica no programa de dosagem de DNA razão 260/280 nm.

3.5 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para digestão do plasmídeo com enzimas de restrição, foram preparadas reações de 50 µL contendo 20 U de enzima de restrição 1, 20 U de enzima de restrição 2, 5 µL de Tampão CutSmart Buffer™, 1 ng de plasmídeo e água Rnase Free. Os tubos foram incubados a 37 °C, durante 60 min e em seguida expostos a 65 °C durante 15 min.

Após o término de inativação das enzimas as amostras foram aplicadas em gel de agarose para observação das bandas do plasmídeo digerido. As enzimas de restrição utilizadas nos testes foram BamHI e HindIII para o plasmídeo IBMP-8.1 e NcoI, ACCI e EcoRI para o plasmídeo que codifica para proteína IBMP-8.4

3.6 ELETROFORESE

3.6.1 Gel de agarose

A análise das frações de DNA plasmidial foram realizadas através de gel preparado com Agarose 1%, Tampão TAE 50X (Tris-Acetato 2M e EDTA 0,05M) e brometo de etídio submetido a eletroforese a 250 mA, 80 V durante 90 min e revelação foi realizada através de sistema de fotodocumentação com transiluminador UV digital.

3.6.2 Gel de poliacrilamida

Para avaliação de frações proteicas foram realizadas eletroforeses em gel utilizando o Criterion™ XT Bis-Tris Gel (Fabricante Bio-Rad®) com 12% de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) utilizando o marcador de peso molecular Marck12™

(Fabricante ThermoFisher®). O corante de escolha foi o Bio-Safe™ Coomassie Stain (Fabricante Bio-Rad®) e a revelação com água.

3.7 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Após a transformação celular, foi selecionada uma colônia através dos fatores maior tamanho, isolamento e formato uniforme. Em um tubo de fundo cônico com capacidade para 50 ml, foram adicionados 20% (v/v) de meio de cultura e canamicina 50 µg/ml, e a colônia de bactérias selecionada. O tubo foi incubado a 37 °C, 200 rpm e o crescimento celular foi acompanhado por DO₆₀₀.

3.8 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 2 litros de capacidade, contendo 25% (v/v) de meio de cultivo suplementado com canamicina 50 µg/ml e 0,1%(v/v) de cultivo do pré-inóculo. O frasco foi mantido sob agitação de 200 rpm por 16 horas a 37°C. Ao final do tempo de incubação foi realizada medida de densidade óptica a 600 nm para controle de processo.

3.9 PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR

3.9.1 Avaliação de volume da batelada

A fim de verificar o rendimento de biomassa x volume de cultivo, foram realizadas bateladas em três volumes distintos (5, 10 e 25L), ambos utilizando saco estéril de uso único com capacidade para até 25 L.

A multiplicação das células de *E. coli* foi realizada em biorreator Wave 20/50 EHT (Fabricante GE®) que possui uma bandeja suporte do saco estéril de uso único. O crescimento bacteriano ocorreu em meio líquido, suplementado com canamicina 50 µg/ml. A taxa de inoculação utilizada foi de 5% (v/v). O equipamento foi configurado na temperatura 37 °C, ângulo de inclinação máxima 9°, agitação de 25 rpm e aeração de 0,4 L/min.

A DO₆₀₀ foi acompanhada e ao atingir valores entre 0,8 e 1,0 ocorreu o início da indução através da adição de IPTG 0,5 mM. A indução da expressão foi mantida por 4 horas.

3.9.2 Avaliação do meio de cultura

Foram executadas bateladas em biorreator Wave 20/50 EHT (Fabricante GE®), utilizando dois meios de cultura distintos. As células transformadas foram multiplicadas em meio LB e meio 2xYT. Em ambos os experimentos a configuração do biorreator foi mantida em temperatura 37 °C, ângulo de inclinação máxima 9°, agitação de 25 rpm e aeração de 0,4 L/min. O tempo de indução teve duração de 4 horas após a cultura atingir DO₆₀₀ maior que 0,8.

3.10 COLETA DA BIOMASSA

Após o término da indução o caldo celular foi retirado do biorreator submetido a centrifugação por 10 minutos a 6000 g e 4 °C e o sobrenadante foi descartado com a biomassa coletada e fracionada em embalagens resistentes a baixa temperatura a massa úmida foi verificada e armazenada em ultrafreezer (-90 a -60 °C).

3.11 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Dois mililitros de amostra de caldo foram centrifugados por 10 minutos a 6000 g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspensa em 400 µL de tampão de extração de proteínas BugBuster® (Fabricante Merck®). Em seguida a suspensão foi mantida sob agitação de 300 rpm, em temperatura ambiente 20 °C, durante 20 minutos.

O extrato foi centrifugado a 14000 g, 4 °C durante 30 min e então o sobrenadante foi coletado e mantido a 4 °C para posterior avaliação através de eletroforese.

3.12 LISE CELULAR

A biomassa foi retirada do ultrafreezer (-90 a -60°C) e então ressuspensa em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8) na proporção 1 g de biomassa para 5 ml de tampão. O coquetel de inibidores de proteases (fabricante Roche®) foi adicionado e em seguida o rompimento celular mecânico ocorreu através de 10 passagens pelo microfluidizador (fabricante Microfluidics®) a 50 psi. A lise celular foi acompanhada através de redução de medida de densidade óptica a 600 nm.

3.13 CLARIFICAÇÃO DO EXTRATO CELULAR

O extrato celular foi centrifugado a 20000 *g*, a 4 °C por 30 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de estreptomicina para concentração final de 1%(v/v). O extrato passou por nova centrifugação a 20000 *g*, a 4 °C por 30 minutos seguida de filtração a vácuo com filtro 0,45 µm. A amostra foi armazenada em refrigerador (2 a 8 °C).

3.14 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE IBMP- 8.1

A purificação do extrato clarificado ocorreu através de cromatografia líquida utilizando o equipamento ÄKTA Avant 150 (Fabricante GE®). Os métodos de purificação, de cada processo, foram configurados utilizando o software Unicorn 7.5 de forma a manter a padronização de insumo e haver a menor intervenção do usuário. Após cada etapa de purificação foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida para visualização da proteína de interesse e decisão da seleção das frações.

3.14.1 Cromatografia de afinidade His Trap

A primeira etapa de purificação da proteína recombinante IBMP-8.1 foi realizada através da técnica de cromatografia de afinidade com a coluna HisTrap HP (Fabricante Cytiva®) de 10 ml. A proteína possui etiqueta de fusão com sequência

de poli-histidinas na posição C-terminal. Neste caso, a IBMP-8.1 fica retida na devido afinidade pelo níquel imobilizado na resina.

Para purificação da quimera o método configurado através do software Unicorn 7.5 foi, equilíbrio da coluna com 10 CV (volume de coluna) utilizando tampão de equilíbrio (Tris HCl 20 mM, cloreto de sódio 300 mM, imidazol 5 mM e 1mM de PMSF), injeção de extrato por bomba de amostra até o acionamento do sensor de ar, lavagem 1 com tampão de equilíbrio 5 CV, lavagem 2 gradiente de 0 a 5% de tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, cloreto de sódio 260 mM, imidazol 500 mM e 1 mM de PMSF) por 8 CV, gradiente de 5 a 80% de tampão de eluição por 15 CV com coleta de frações de 5 ml e degrau de 5 CV com 100% de tampão de eluição.

3.14.2 Diálise para troca de tampão

Após a seleção das frações de interesse da primeira etapa de purificação do extrato proteico foi necessário realizar a troca do tampão para reduzir a quantidade de NaCl através de diálise em cassete com poro de 3,5 kDa (Fabricante ThermoFisher®) submerso em 2 L de tampão de equilíbrio da Coluna Hitrap SP HP (Fabricante Cytiva®) para proteína IBMP 8-1 durante 16 horas.

FIGURA 3 - CASSETE DE DIÁLISE



Fonte: (THERMOFISHER, 2022)

3.14.3 Cromatografia de troca iônica

A segunda etapa para purificação da proteína IBMP 8-1 consistiu em uma cromatografia por troca catiônica utilizando a coluna Hitrap SP HP (Fabricante Cytiva®). O método configurado no software Unicorn 7.5 foi de 5 CV de tampão de equilíbrio (Tris HCl 20 mM, fosfato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 5 mM e 1 mM de PMSF), injeção de amostra por bomba automática até acionamento do sensor de ar, lavagem de 5CV com tampão de equilíbrio, degrau de 3% de tampão de eluição (Tris HCl 20 mM, fosfato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 1 M e 1 mM de PMSF) por 6 CV, gradiente de 3 a 50% de tampão de eluição por 6 CV com frações de 3 ml e um degrau de 100% de tampão de eluição por 6 CV. Após a observação do cromatograma foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE.

A partir da avaliação conjunta do SDS-PAGE e do cromatograma foi realizada a seleção das frações de interesse. Todas as frações selecionadas foram unidas em um tubo, homogeneizadas e então o insumo foi quantificado.

3.14.4 Quantificação proteína IBMP 8-1

A proteína IBMP 8-1 não possui os aminoácidos triptofano, tirosina e cisteína em sua composição por esse motivo não absorve em comprimento de onda 280 nm (PACE et al., 1995). Senso assim concentração da proteína foi determinada utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Fabricante Thermo Scientific®), através da medida das ligações peptídicas em densidade óptica de comprimento de onda de 205 nm.

3.14.5 Diálise da condição estoque

Após a quantificação do insumo foi realizado o ajuste de concentração através da diluição com o tampão de estoque (Tris HCl 50 mM, cloreto de sódio 25 mM e 1 mM de PMSF) com alvo em 2,0 mg/ml.

Em situações em que a concentração da proteína IBMP-8.1 esteve menor que 2 mg/ml foi realizada uma etapa de diálise de concentração. A diálise ocorreu sob refrigeração e branda agitação utilizando o tampão de estoque acrescido de PEG 20000 (peso molecular), na proporção de 20 vezes o volume da amostra.

3.15 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE IBMP-8.4

3.15.1 Cromatografia de afinidade His Trap

A primeira etapa de purificação da IBMP 8-4 foi a cromatografia de afinidade utilizando o cromatógrafo líquido ÄKTA Avant 150 (Fabricante GE®) e a coluna HisTrap HP (Fabricante Cytiva). O equipamento foi configurado para atuar em equilíbrio da coluna com 5 CV utilizando tampão de equilíbrio (Tris HCl 50 mM, cloreto de sódio 260 mM, imidazol 3 mM e 1mM de PMSF). Seguido de injeção do extrato proteico por bomba de amostra até o acionamento do sensor de ar. Posterior lavagem com tampão de equilíbrio 2 CV, gradiente de 0 a 1,5% de tampão de eluição (Tris HCl 20 mM, cloreto de sódio 300 mM, imidazol 500 mM e 1mM de PMSF) por 8 CV, gradiente de 1,5 a 40% de tampão de eluição por 8 CV com coleta de frações de 3 ml e degrau de 5 CV com 100% de tampão de eluição.

3.15.2 Diálise para troca de tampão

Para proteína IBMP 8-4, foi realizada diálise antes do início da próxima cromatografia. A troca de tampão ocorreu utilizando cassete de membrana de 10 kDa de porosidade e o tampão de equilíbrio heparina. Os cassetes contendo as frações selecionadas após análise do cromatograma e gel de poliacrilamida ficaram submersos em 2 L de tampão de equilíbrio durante 16 horas sob refrigeração 2 a 8 °C.

3.15.3 Cromatografia de afinidade HiTrap Heparina HP

Após a diálise, o processo de purificação da proteína IBMP 8-4 segue com uma cromatografia por afinidade a Heparina. O método programado no equipamento foi passagem durante 5 CV de tampão de equilíbrio (Tris HCl 50 mM, cloreto de sódio 20 mM e 1 mM de PMSF), aplicação da amostra até acionar o sensor de ar do equipamento. Seguido de lavagem com tampão de equilíbrio por 10 CV, gradiente 0 a 20 % de tampão de eluição (Tris HCl 50 mM, cloreto de sódio 1 M e 1 mM de PMSF) por 7 CV coletando frações de 3 ml e finalizado com degrau de 100% de tampão de eluição por 5 CV.

Ao fim da corrida cromatográfica foi realizado um SDS-Page que em conjunto com os resultados do cromatograma viabilizou a seleção das frações que foram reunidas e posteriormente quantificadas para compor o insumo.

3.15.4 Quantificação proteína IBMP 8-4

A concentração da proteína IBMP 8-4 foi determinada utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific®) através da medida densidade óptica de comprimento de onda de 280 nm.

3.15.5 Diálise da condição estoque

Após a quantificação do insumo, é realizado o ajuste de concentração através da diluição com o tampão de estoque (Tris HCl 50 mM, cloreto de sódio 100 mM e 1 mM de PMSF) com alvo em 2 mg/ml.

Em situações em que a concentração da proteína IBMP-8.4 foi menor que 2 mg/ml se realizou uma diálise de concentração. A diálise ocorreu sob refrigeração em tampão de estoque acrescido de PEG 20000 (peso molecular), na proporção de 20 vezes superior ao volume da amostra.

3.16 DILUIÇÃO E ENVASE DO PRODUTO

Após a quantificação, pós-diálise, o insumo com concentração ajustada para 2 mg/ml em tampão de armazenamento passou por filtração utilizando membrana de poro 0,22 µm.

Por fim, a proteína recombinante foi envasada no volume de 1ml em cada microtubo devidamente rotulado com nome do insumo, lote, data de validade, data de fabricação, volume, concentração e temperatura de armazenamento em freezer (-30 a -15 °C). A amostragem foi enviada ao setor de Controle de Qualidade para análise, liberação e realização do estudo de estabilidade do produto.

3.17 WESTERN BLOT

3.17.1 Eletroforese

Para separação das moléculas foram preparados géis de empilhamento e separação de poliacrilamida contendo SDS. A concentração da poliacrilamida foi de 5% e 15% respectivamente. As proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4, na quantidade de 4 µg, foram aquecidas até desnaturação junto com o tampão de amostra. A eletroforese foi realizada a 120 V.

3.17.2 Transferência para membrana de nitrocelulose

A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi realizada através um sistema de transferência semisseco (Fabricante Bio-rad®) a 20V durante 1 hora. O “sanduíche” composto em ordem de cima para baixo por papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose e papel filtro, foi embebido em tampão de transferência de (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) e submetido a 20V por 1 hora.

Após lavagem com água, a membrana de nitrocelulose foi incubada na solução de bloqueio (PBS-Tween a 0,05%, leite desnatado a 5%) durante 1 hora, sob agitação. Neste ensaio foram utilizadas amostras do painel AEQ_INCQS com o soro diluído positivo para Chagas na proporção de 1:100. Após a incubação por 1 hora em temperatura ambiente foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween a 0,05% por 5 minutos. A membrana foi incubada por 1 hora com a anti-globulina humana (anti-IgG) conjugada a peroxidase diluída 1:10000 em PBS-Tween a 0,05% e leite desnatado a 5%. Após três etapas de lavagens foi realizada a incubação com Pierce™ ECL (Fabricante Thermo Scientific™) e a leitura para detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência.

3.18 ENCERRAMENTO DO LOTE PRODUTIVO

Após o término do lote de produção de cada proteína foi realizado o processo de limpeza da área produtiva e equipamentos, conforme protocolos

internos da empresa baseados em BPF. Todo material utilizado passou por descontaminação térmica após os processos.

Foi necessário também compor o dossiê/histórico de produção que contém todos os registros de processo e resultados (Ex: manuais, registro de limpeza de cada sala, dados de temperatura, pressão e umidade, cromatogramas). A documentação foi entregue ao setor da Garantia da Qualidade do IBMP para avaliação e verificação do processo visto que é necessário atender as exigências das normas para liberação posterior de envio de insumos intermediários ao cliente.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ELABORAÇÃO DE DOCUMENTAÇÃO

A partir do protocolo recebido do setor de Desenvolvimento Tecnológico, do IBMP, foram elaboradas as documentações do setor de produção. Por motivo de confidencialidade industrial os manuais, instruções de equipamentos, formulários, que descrevem detalhadamente os processos não serão divulgados neste trabalho. Todos os documentos foram elaborados de forma a atender o capítulo 3 da RDC nº665 de 2022 (anexo I), garantindo assim que todos os colaboradores designados, realizem os processos produtivos de forma padronizada.

A eficiência da descrição nos documentos foi corroborada pelo sistema de garantia pois não houve abertura de NC relacionada aos manuais dos lotes de produção das proteínas IBMP 8-1 e 8-4. Segundo ANVISA, uma não conformidade corresponde ao não cumprimento de um requisito especificado relativo às BPF (ANVISA, 2019).

Ao executar processos sem desvios e registros de não conformidade garante-se o cumprimento das normas técnicas que se destinam ao produto para garantir a execução dos procedimentos de forma correta e o conceito de conformidade descrito por Antunes (ANTUNES, 2002). Além de comprovar a eficiência do treinamento realizado, uma vez que, segundo Calarge, os treinamentos dos funcionários, devem atender variados objetivos, como redução de erros, envolvimento no trabalho, aumento de motivação, criação de capacidade de resolução e prevenção de problemas e melhor comunicação (CALARGE; SATOLO; SATOLO, 2007).

Os manuais de produção elaborados descrevem todas as atividades realizadas, além de conter campos para preenchimento durante o processo. Esses campos são preenchidos com as informações necessárias para manter a rastreabilidade de todo o ciclo de produção das proteínas IBMP 8-1 e 8-4 como lote de produção de cada solução, lote da matéria prima, validade dos componentes, pessoa responsável por executar o processo produtivo, data, hora, registro de limpeza. A coleta de dados e armazenamento dos documentos é importante não somente para acompanhamento e controle estatístico do processo, como também é exigido pela RDC nº665/2022 (Anexo I) no item 3.2 que descreve que o fabricante

deve manter registros históricos de produtos, estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os registros históricos dos produtos sejam mantidos para cada lote ou série para demonstrar que os produtos foram fabricados de acordo com o registro mestre do produto e de acordo com os requisitos da RDC.

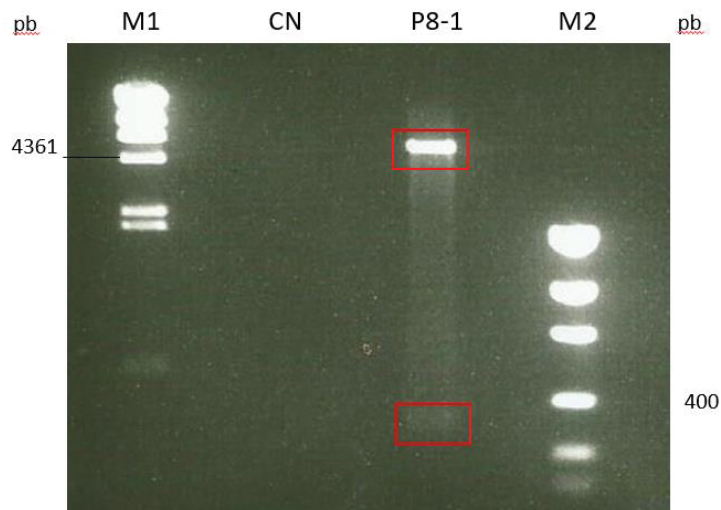
Os documentos elaborados, preenchidos e entregues a Garantia da Qualidade atendem ao capítulo III da RDC 665/2022 que trata sobre o registro mestre e histórico do produto e seus itens exigidos.

A fabricação das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 seguiram os protocolos internos da empresa e a RDC 665/2022 que trata de rastreabilidade foi atendido. Para lotes piloto os registros foram realizados em cadernos de protocolo e para lotes com comercialização ao cliente os registros foram realizados através de manuais e instruções de trabalho.

4.2 MULTIPLICAÇÃO DO PLASMÍDEO

A imagem FIGURA 4, apresenta a digestão enzimática realizada para o plasmídeo da IBMP-8.1 e permite a visualização evidente do fragmento de 5369pb e a banda 303pb em forma de sombra. Como já esperado o controle negativo aplicado sem plasmídeo não houve digestão enzimática.

FIGURA 4 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO PLASMÍDEO



Fonte: O autor

Legenda: **M1**: Marcador λ /HindIII, **CN**: Controle negativo, teste com tratamento enzimático, porém sem adição de plasmídeo, **P8-1**: Plasmídeo IBMP-8.1 digerido com as enzimas BamHI e HindIII, visualização dos fragmentos de 5369 pb e 303pb, **M2**: Marcador Low DNA Mass.

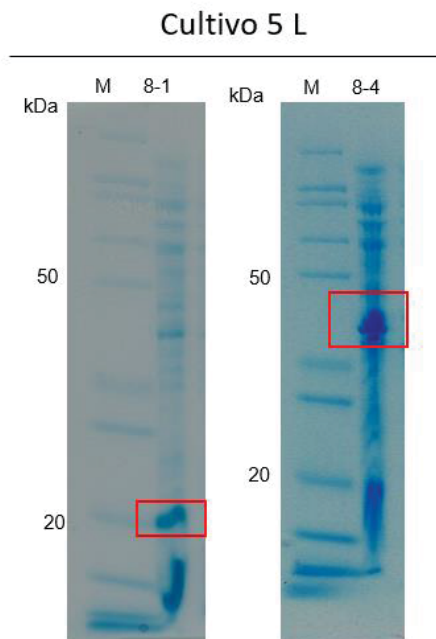
Os lotes de plasmídeo produzidos em ambiente de produção resultaram em um alto rendimento. Os plasmídeos são mantidos em freezer (-30 a -15°C) uma vez que, a quantidade produzida foi suficiente, para realizar mais de 100 lotes de produção de cada proteína. Segundo Nguyen, a estabilidade do plasmídeo é mantida por pelo menos três anos, quando armazenado a -20 °C (NGUYEN et al., 2018).

O processo de produção do plasmídeo em área limpa, têm duração de três dias, então ao prolongar o intervalo entre as produções de plasmídeos, o custo de produção é reduzido e aumenta-se o tempo de disponibilidade da planta produtiva, permitindo a entrada de novos produtos em área de produção.

4.3 AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE VOLUME

A etapa de avaliação do aumento de volume do cultivo celular foi realizada utilizando meio de cultura LB. Para cada proteína foram produzidos lotes de biomassa através a partir de cultivos celular de 5, 10 e 25L no biorreator Wave 20/50 EHT (Fabricante GE®), os resultados foram compilados na tabela 2. Em todos os lotes houve a confirmação da expressão da proteína de interesse conforme é possível verificar nas figuras 5, 6 e 7. As bandas correspondentes ao tamanho de cada proteína 17 kDa para IBMP-8.1 e 42 kDa para IBMP-8.4 está presente no lote correspondente. As imagens dos géis de eletroforese, figuras 5 a 7, apresentam a separação proteica do extrato celular de cada biomassa produzida.

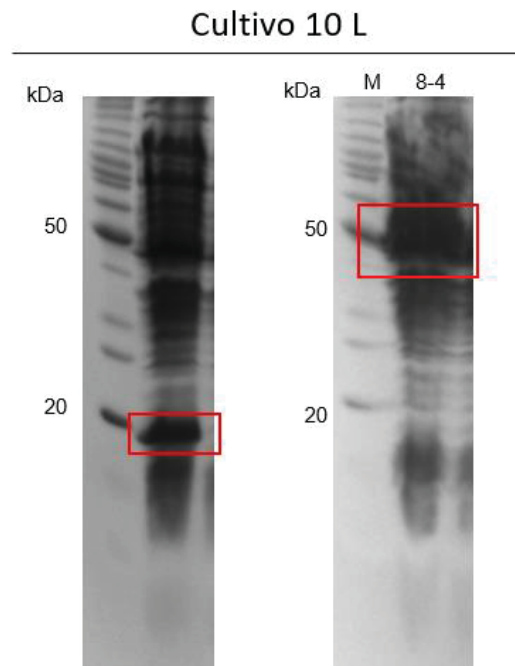
FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 e IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 5 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE



Fonte: O autor

Legenda: **M1**: Marcador molecular, **8.1**: extrato celular IBMP-8.1 e **8.4**: extrato celular IBMP-8.4.

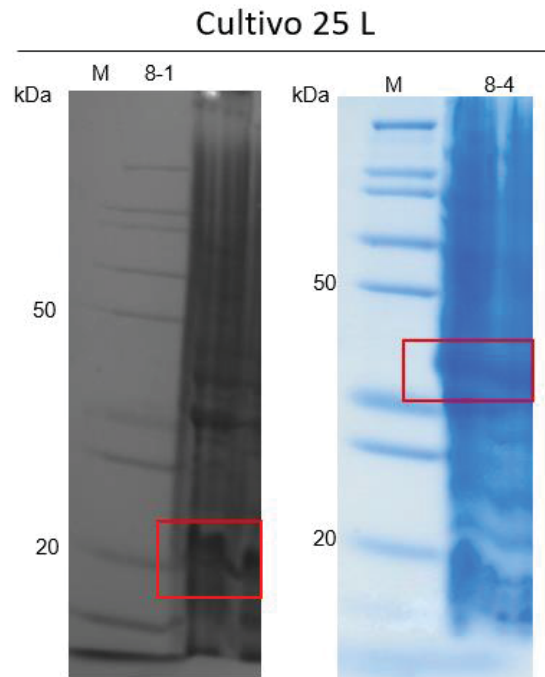
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 E IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 10 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE



Fonte: O autor

Legenda: **M1**: Marcador molecular, **8.1**: extrato celular IBMP-8.1 e **8.4**: extrato celular IBMP-8.4.

FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS IBMP-8.1 E IBMP-8.4 EXPRESSAS EM 25 L DE CULTIVO CELULAR EM BIORREATOR WAVE



Fonte: O autor

Legenda: **M1**: Marcador molecular, **8.1**: extrato celular IBMP-8.1 e **8.4**: extrato celular IBMP-8.4.

Os resultados são condizentes com outros trabalhos já publicados que indicam que a cepa BL21 (DE3) é largamente utilizada para produção de proteínas recombinantes independente do volume de cultivo (BELLÃO, 2006; CARMIGNOTTO; AZZONI, 2019; DEMAÏN; VAISHNAV, 2009; INVITROGEN, 2010; RATELADE et al., 2009).

Os processos de produção de biomassa e purificação das quimeras não ocorreram de forma simultânea devido a disponibilidade da planta produtiva, atendimento as normas BPF e quantidade de equipamentos. A quantidade de biomassa úmida coletada após cada processo de cultivo celular está apresentada na TABELA 2 juntamente com o rendimento de biomassa por litro de cultivo.

TABELA 2 - RENDIMENTO DE BIOMASSA ÚMIDA EM DIFERENTES VOLUMES DE CULTIVO CELULAR

Volume de cultivo	Biomassa IBMP-8.1		Biomassa IBMP-8.4	
	Massa úmida (g)	Rendimento g/L	Massa úmida (g)	Rendimento g/L
5 litros	15,8	3,16	18,74	3,75
10 litros	25,7	2,57	27,2	2,72
25 litros	61,0	2,44	57,9	2,32

Fonte: O autor

O biorreator de onda “Wave” é formado por uma base móvel que suporta uma bandeja e uma bolsa estéril descartável em forma de traveseiro. A plataforma proporciona um movimento oscilatório que gera ondas na interface gás-líquido no interior da bolsa, dessa forma as células permanecem uniformemente suspensas em todo o líquido (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008; ZHONG, 2010). O biorreator de onda possui como vantagens o uso de bolsas descartáveis, que reduz as chances de contaminação, implementação mais rápida de processos produtivos, evitam processos de validação de limpeza entre lotes do equipamento, baixa tensão de cisalhamento, alta homogeneidade (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008; JUNNE et al., 2013). O sistema proporciona uma mistura eficiente e homogênea através de agitação suave e não gera forças de cisalhamento elevadas resulta em um ambiente de cultura homogêneo sem zona mortas (PANCKOW et al., 2019).

Todos os cultivos foram realizados no formato batelada. Segundo Chico e colaboradores, é necessário respeitar algumas características nessa decisão como linhagem celular, capacidade produtiva, demanda do cliente, conhecimento do grupo desenvolvedor do processo, eficiência e rendimento do processo de purificação e aspecto regulatórios (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008). Dessa forma foram considerados, tempo de crescimento da *E. coli*, maquinário já em uso na empresa, experiência da equipe técnica em processos utilizando o biorreator de ondas, contrato de demanda assinado, tamanho das colunas para cromatografia disponível e capacidade do biorreator da planta de produção para determinação dos volumes de cultivo.

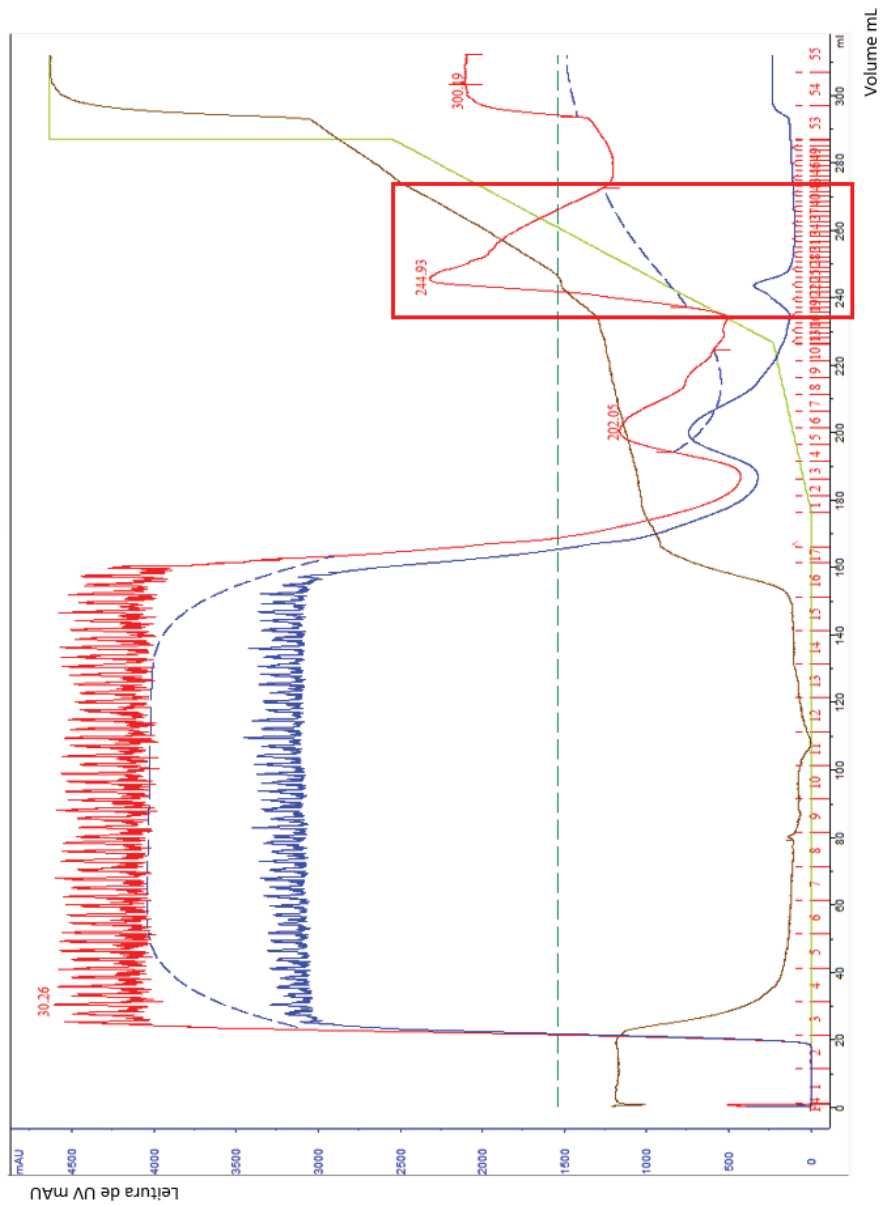
Todas as condições testadas de biomassa, de cada quimera, seguiram para etapa de purificação. Pois através da purificação da proteína é possível quantificar o

rendimento de mg de proteína purificada por litro de cultivo. Devido a quantidade de dados gerados optou-se por apresentar um exemplo de purificação e eletroforese para cada proteína.

A FIGURA 8 trata da purificação da proteína IBMP-8.1 expressa em cultivo de 5L, com a coluna cromatográfica Histrap HP. Como já mencionado anteriormente, a proteína IBMP-8.1 não gera sinal em UV 280 nm. Por esse motivo durante a purificação dessa proteína foi acionado o comprimento de onda UV 230 nm que serviu de referência para avaliação da presença de proteína IBMP-8.1.

O sinal de UV 230, linha vermelha da FIGURA 8, é elevado durante o carregamento amostra e decai em seguida. Durante a etapa de lavagem 2 ocorre a formação de um pico, porém como é possível observar no poço 3 da FIGURA 9, o sinal não corresponde a proteína IBMP-8.1 pois não há presença de banda próximo a 20 kDa. A eluição da proteína ocorre em presença do imidazol, por volta de 100 mM e se estende até aproximadamente 300 mM de imidazol. A maior concentração da proteína IBMP-8.1 encontra-se nas frações de 25 a 37, sendo as frações de 29 a 33 com menor quantidade de impurezas. As frações de 23 a 41 foram selecionadas e unidas para realização da diálise.

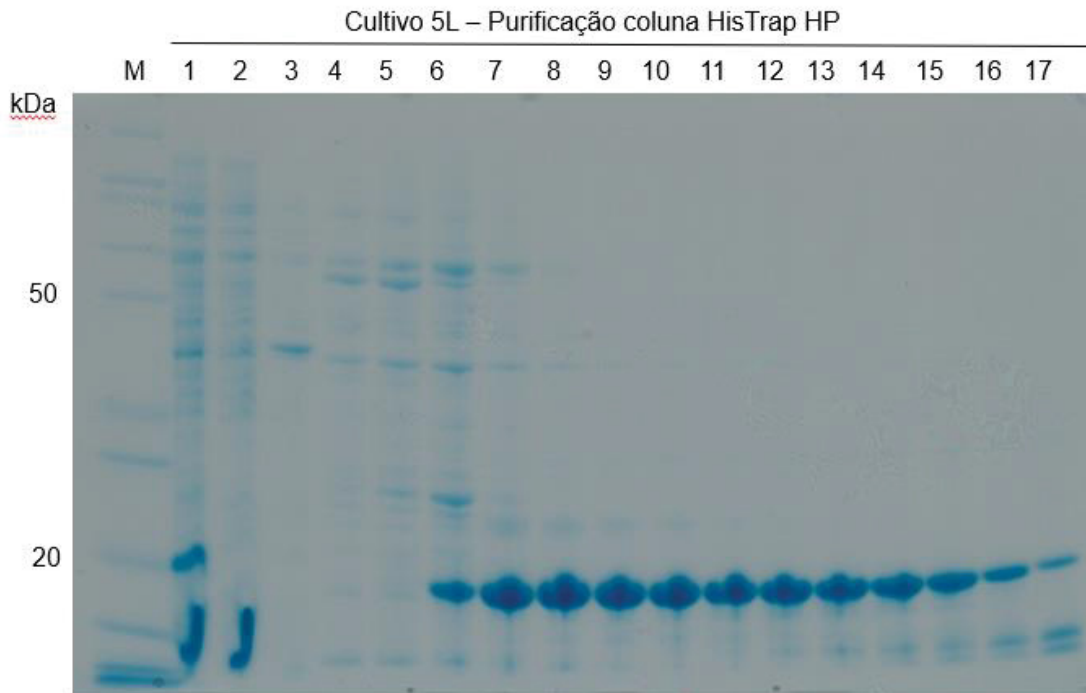
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5ML PROTÉINA IBMP-8.1



Fonte: O autor

Legenda: Linha vermelha: Absorbância a 230 nm, linha azul: absorbância 280 nm, linha verde: gradiente de tampão de eluição, linha marrom: condutividade.

FIGURA 9 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HISTRAP HP



Fonte: O autor.

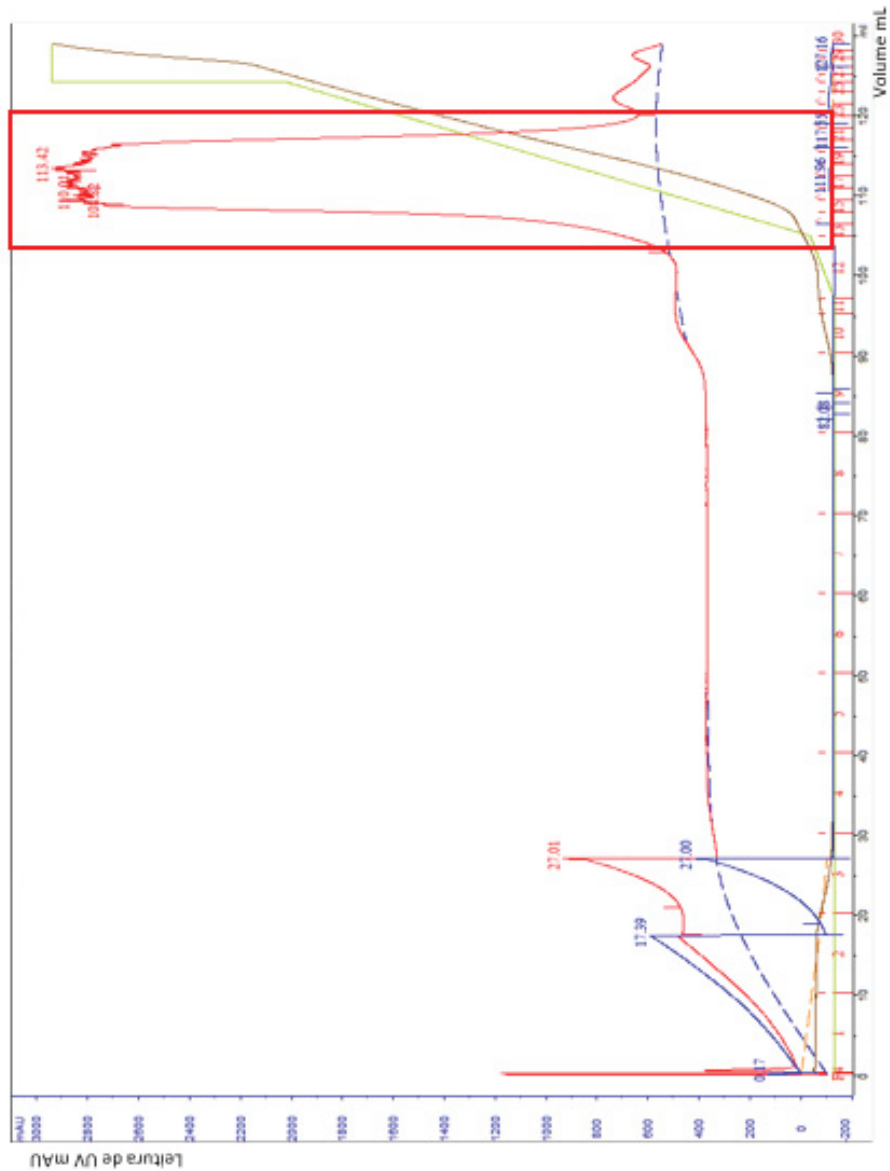
Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Extrato, **2.** Fração 9, **3.** Lavagem 2, **4.** Fração 19, **5.** Fração 21, **6.** Fração 23, **7.** Fração 25, **8.** Fração 27, **9.** Fração 29, **10.** Fração 31, **11.** Fração 33, **12.** Fração 35, **13.** Fração 37, **14.** Fração 39, **15.** Fração 41, **16.** Fração 43, **17.** Fração 45.

A baixa concentração de imidazol presente no tampão de equilíbrio, 5 mM, é aplicada seguindo orientação do fabricante da resina, dessa forma ocorre a redução de ligação não específica das proteínas da célula hospedeira (CYTIVA, 2021a). Conforme verificado na etapa de desenvolvimento em escala de bancada, a proteína IBMP-8.1 demonstrou alta afinidade pelo níquel, sendo eluída em maior concentração de imidazol. Em concentrações maiores, 500 mM no tampão de eluição, o imidazol garante uma completa eluição da proteína marcada com histidina (CYTIVA, 2021a). A resina não foi alterada pois trabalhos anteriores descreveram maior pureza na purificação de antígeno recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel em relação a protocolos com o uso de cobalto (ARAÚJO, 2008; CROWE et al., 1994; GOMES, 2010). A resina de níquel possui outra vantagem que é a maior capacidade de suportar condições redutoras (GOMES, 2010; LI, 2010). Já a presença da cauda de histidina continua sendo uma alternativa rápida, econômica e eficiente para purificação (CROWE et al., 1994; LIN et al., 2015).

A cromatografia de troca iônica foi realizada como passo de polimento na purificação da quimera IBMP-8.1. Analisando a Figura 10 é possível observar que, conforme esperado, houve a eluição da proteína durante a etapa de gradiente do tampão de eluição. Na Figura 11 observa-se que as frações de 13 a 23 contêm a proteína purificada. Sendo que as frações 15 a 24 possuem a maior concentração de IBMP-8.1. As frações de 15 a 22 foram unidas e quantificadas para avaliação do rendimento e ajuste de concentração.

A versatilidade da troca iônica aliada a alta resolução e elevada capacidade de ligação, tornam a resina SP HP uma escolha natural para as etapas finais de um esquema de purificação (CYTIVA, 2021a). Segundo Kilikian, quando comparada a outros métodos a cromatografia de troca iônica apresenta as seguintes vantagens: simples aumento de escala, alta resolução, alta capacidade de ligação e aplicação versátil (JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

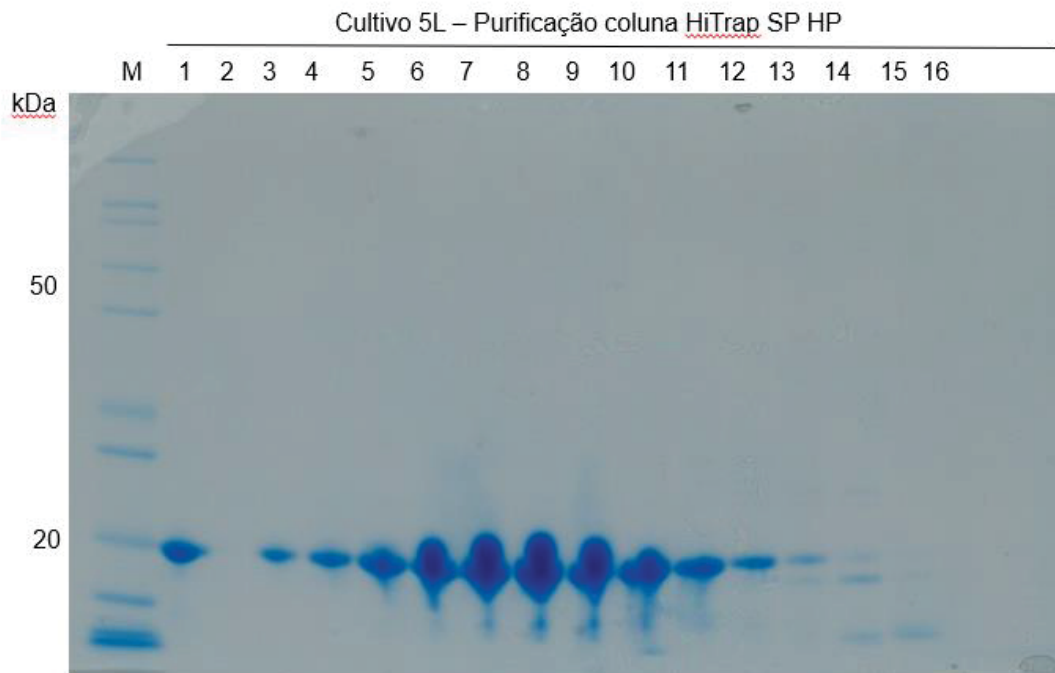
Figura 10 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA COM COLUNA HITRAP SP HP PROTEÍNA IBMP-8.1



Fonte: O autor.

Legenda: Linha vermelha: absorbância a 230 nm, Linha azul: absorbância 280 nm, Linha verde: gradiente de tampão de eluição.

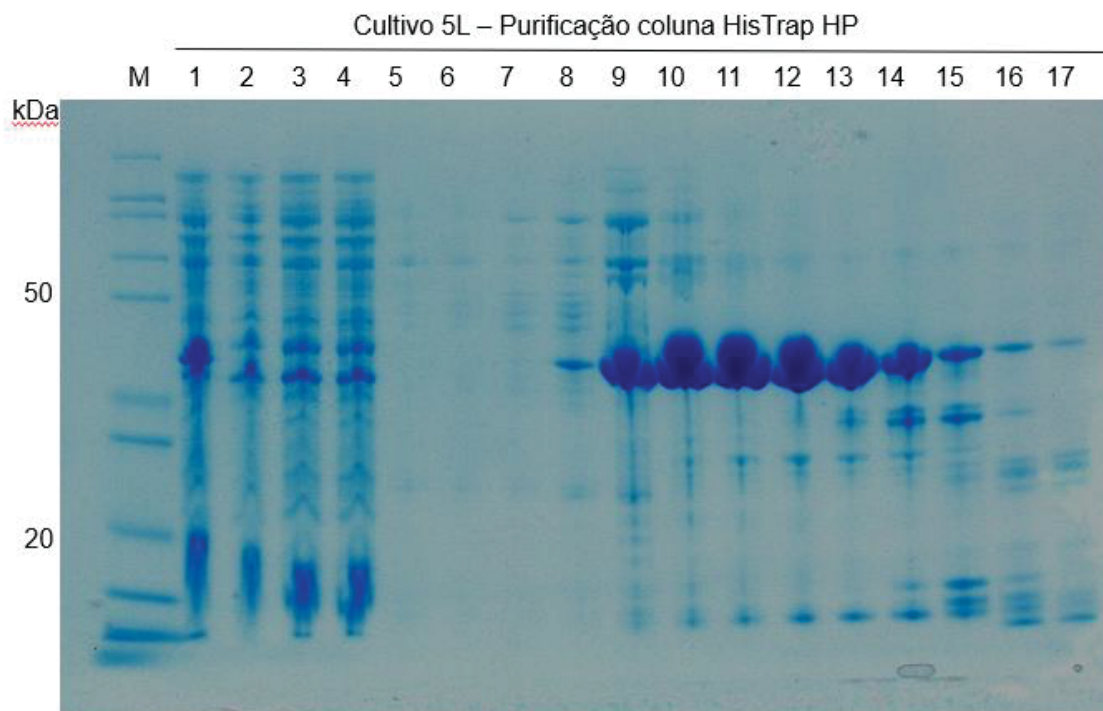
Figura 11 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HITRAP SP HP



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Extrato, **2.** Fração 8, **3.** Fração 13, **4.** Fração 14, **5.** Fração 15, **6.** Fração 16, **7.** Fração 17, **8.** Fração 18, **9.** Fração 19, **10.** Fração 20, **11.** Fração 21, **12.** Fração 22, **13.** Fração 23, **14.** Fração 24, **15.** Fração 27, **16.** Vazio.

As duas etapas de purificação foram executadas para todos os lotes de biomassa da quimera IBMP-8.4. Avaliando a Figura 12 é observado a variação do sinal a 280 nm que indica que ocorreu a eluição da quimera durante o gradiente do tampão de eluição. Conforme Figura 13 as frações de possuem proteína IBMP-8.4, porém as frações de 16 a 17 contêm a maior quantidade de proteína. Analisando o cromatograma e o resultado da eletroforese foi selecionado as frações de 26 a 39 para seguir para segunda etapa de purificação. Conforme o fabricante da resina é imprescindível o uso de imidazol de boa qualidade para que não ocorra interferência no sinal a 280 nm (CYTIVA, 2021a).

Figura 13 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HISTRAP HP



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Extrato, **2.** Fração 3, **3.** Fração 6, **4.** Fração 10, **5.** Fração 15, **6.** Fração 16, **7.** Fração 23, **8.** Fração 25, **9.** Fração 27, **10.** Fração 29, **11.** Fração 31, **12.** Fração 33, **13.** Fração 35, **14.** Fração 37, **15.** Fração 39, **16.** Fração 41, **17.** Fração 43.

A Figura 14 demonstra a sinal a 280 nm durante a segunda etapa de purificação da proteína IBMP-8.4. Ao analisar a imagem verifica-se a eluição da proteína de forma majoritária durante o gradiente de tampão de eluição. Porém ao observar as Figura 15 e Figura 16 identifica-se que houve presença de proteína IBMP-8.4 na fração não ligada do carregamento da amostra e lavagem. Segundo Bresolin e colaboradores, as condições operacionais como pH, força iônica, tipo ou composição da solução tamponante também possuem grande influência no processo de purificação por afinidade (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Os tampões preparados estão de acordo com as concentrações sugeridas pelo fabricante da resina e a condutividade do processo apresenta valores baixos durante o carregamento da amostra (CYTIVA, 2021a). A presença da proteína IBMP-8.4 nas frações de não ligado durante o carregamento de amostra indica que a capacidade de ligação da coluna foi excedida.

As frações de Lavagem 23 a Fração 19 que corresponde ao pico de eluição foram selecionadas para realização da diálise de concentração e quantificação.

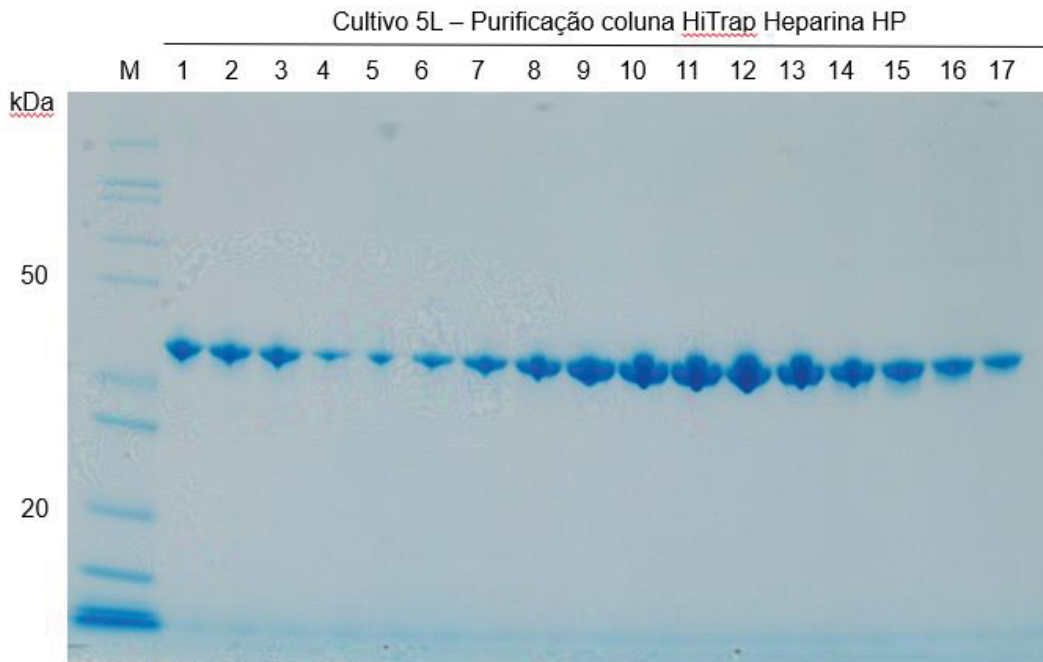
Figura 14 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HITRAP HEPARINA HP 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4



Fonte: O autor.

Legenda: Linha azul: absorbância 280 nm, linha verde: concentração de tampão de eluição, linha marrom: condutividade.

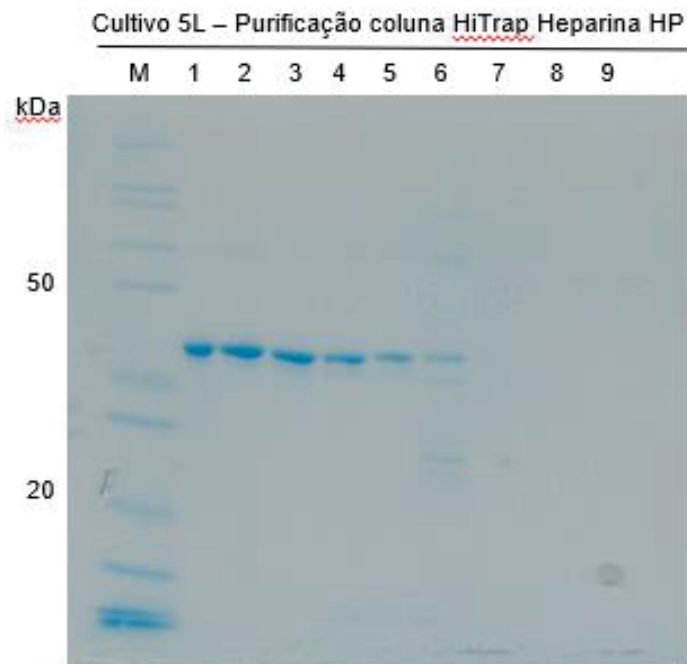
Figura 15 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP – GEL 1



Fonte: O autor

Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Fração 10, **2.** Fração 15, **3.** Fração 20, **4.** Lavagem 23, **5.** Fração 7, **6.** Fração 8, **7.** Fração 9, **8.** Fração 10, **9.** Fração 11, **10.** Fração 12, **11.** Fração 13, **12.** Fração 14, **13.** Fração 15, **14.** Fração 16, **15.** Fração 17, **16.** Fração 18, **17.** Fração 19.

Figura 16 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP – GEL 2

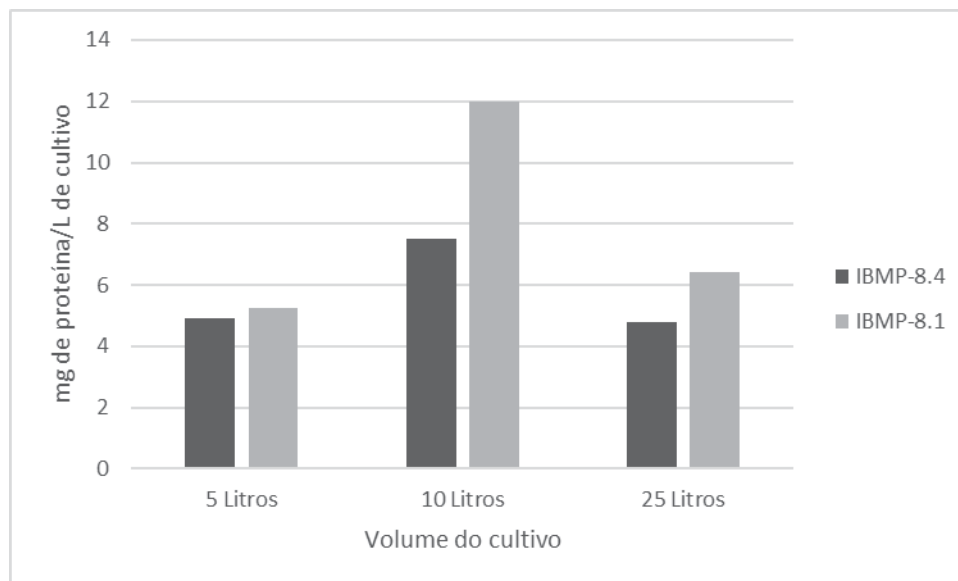


Fonte: O autor

Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Fração 20, **2.** Fração 21, **3.** Fração 22, **4.** Fração 23, **5.** Fração 24, **6.** Fração 25, **7.** Fração 26, **8.** vazio, **9.** vazio.

O gráfico 1 apresenta o rendimento de miligrama de proteína por litro de cultivo de cada processo após término das etapas purificação para cada quimera em nos volumes de 5, 10 e 25L.

Gráfico 1 -RENDIMENTO DE PROTEINA PURIFICADA DE ACORDO VOLUME DE CULTIVO NO BIORREATOR WAVE



Fonte: O autor

Ao analisar a TABELA 2 nota-se que aumento de volume da batelada resultou em menor rendimento de massa úmida por litro de cultivo. Porém ao observar também o gráfico 1, identifica-se que os valores não estão diretamente ligados, uma vez que o cultivo de 5L resultou em maior rendimento de biomassa úmida, porém menor rendimento de proteína purificada quando comprado aos resultados de 10 e 25 litros.

Os cultivos celulares para crescimento da biomassa contendo material genético que codifica para as proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram realizados em biorreator de ondas utilizando saco descartável de volume útil fixo de 25 L. Dessa forma, os ensaios de 5 L e 10 L utilizaram, respectivamente, as capacidades de 20% e 40% do volume útil do biorreator.

As três condições de cultivo proporcionaram a expressão das proteínas de interesse. Após a etapa de purificação de cada biomassa, conforme o gráfico 1, o

rendimento de proteína foi maior no cenário de 10 L de cultivo. Os resultados obtidos demonstram que, ao modificar o volume de cultivo de 5 L para 10 L houve um incremento no rendimento de proteína. Os valores correspondem um aumento de 130% e 53% das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 respectivamente. Já a mudança de volume de 10 L para 25 L não atendeu as expectativas de novo aumento no rendimento. O crescimento pode ter sido afetado pela manutenção do valor de agitação, Oosterhuis e colaboradores observaram que para melhoria do kLa em cultivos superiores a 10L foi necessário alta taxa de agitação (OOSTERHUIS et al., 2011).

Independentemente do volume de cultivo, o tempo do processo da biomassa e colaboradores necessários para produção dos lotes são similares. Por esse motivo, não é financeiramente atraente que o lote de 25 L gere um rendimento de proteína próximo aos valores encontrados em cultivo de 5 L. Alguns fatores ambientais influenciam no crescimento bacteriológico e podem ter afetado o rendimento, a formulação do meio de cultura, a quantidade de oxigênio dissolvido, a temperatura, o pH e a taxa de diluição (MOO-YOUNG et al., 1996). Dessa forma as taxas de oxigenação e cisalhamento foram distintas entre os cenários. Segundo Westbrook, tensões oxidativas e de cisalhamento podem ser significativamente melhoradas sob condições otimizadas de fornecimento de oxigênio e agitação (WESTBROOK et al., 2014; ZHAN et al., 2019). O modelo do equipamento disponível na planta de produção do IBMP, não permite a alimentação do biorreator com oxigênio, dessa forma o “headspace” de cada volume avaliado pode apresentar influência no rendimento final devido influência da aeração. No biorreator de ondas, a onda se propaga a partir do canto do saco instalado, formando uma ondulação ao longo do comprimento do saco até que a altura crítica seja alcançada e gere a quebra da onda. Com o aumento de volume de cultivo no biorreator, ocorre a geração de ondas mais longas que atingem avançam pelo biorreator antes de desacelerar e quebrar. Dessa forma há uma redução de transferência de ar turbulento, uma vez que a onda quebra mais perto do final do saco (BAI; MOO-YOUNG; ANDERSON, 2019; WESTBROOK et al., 2014).

O meio de cultura LB é comumente usado para o cultivo de *E. coli* devido o simples preparo, possuir alto teor de nutrientes e osmolaridade ideal para crescimento celular no início da fase logarítmica. Porém não é a melhor opção para alcançar alta densidade de células, pois apesar de ser um caldo rico, o crescimento

cessa em densidade celular relativamente baixa. O fato ocorre porque o LB contém quantidades escassas de carboidratos (e outras fontes de carbono utilizáveis), o que força as células a utilizarem aminoácidos como fonte de carbono. Conseqüentemente eleva à produção de amônio, que aumenta o pH da cultura (CARMIGNOTTO; AZZONI, 2019; ROSANO; CECCARELLI, 2014a; SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007; STUDIER, 2005).

Para o lote de 25L foi implementado a etapa de pré-inóculo com o objetivo de proporcionar melhor reprodução da *E. coli*. Segundo (LEE et al., 2007), este é o período onde as condições de cultivo são mais favoráveis, as células são mais jovens, o meio possui uma maior quantidade de nutrientes, pois neste momento o mais importante para a célula é garantir sua replicação. Ao realizar o crescimento do pré-inóculo, a quantidade de células é expandida até atingir a biomassa necessária que será utilizada de inóculo para a etapa de crescimento seguinte (ALMEIDA, 2013).

Conforme Chico e colaboradores, o aumento de volume da batelada operacionalmente, facilita o controle e monitoramento do processo produtivo, podendo propiciar um lote homogêneo do produto de interesse com um único bioprocessos (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008). Além disso a produção de um lote maior apresenta vantagens já que, os custos com operação e manutenção de uma linha com vários equipamentos de pequeno porte podem ser maiores do que com um único de grande volume (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008).

Em ambiente de produção é esperado que durante o processo ocorra o sincronismo entre uma alta concentração celular e um baixo custo produtivo. Devido os resultados obtidos não atenderem a expectativa de aumento expressivo de proteína em maior volume de cultivo, o uso do meio de cultura LB foi encerrado e um novo meio de cultura foi avaliado. Devido o tempo de processo de produção de biomassa ser mantido independente do volume de cultivo no biorreator e o aumento de volume da batelada gerar um lote homogêneo do produto de interesse com um único bioprocessos foi determinado o avanço dos estudos de melhoria de somente para cultivo celular de 25 L (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008). Dessa forma mantêm-se o objetivo do trabalho na busca de maior rendimento de proteína e menor custo de produção.

4.4 AVALIAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

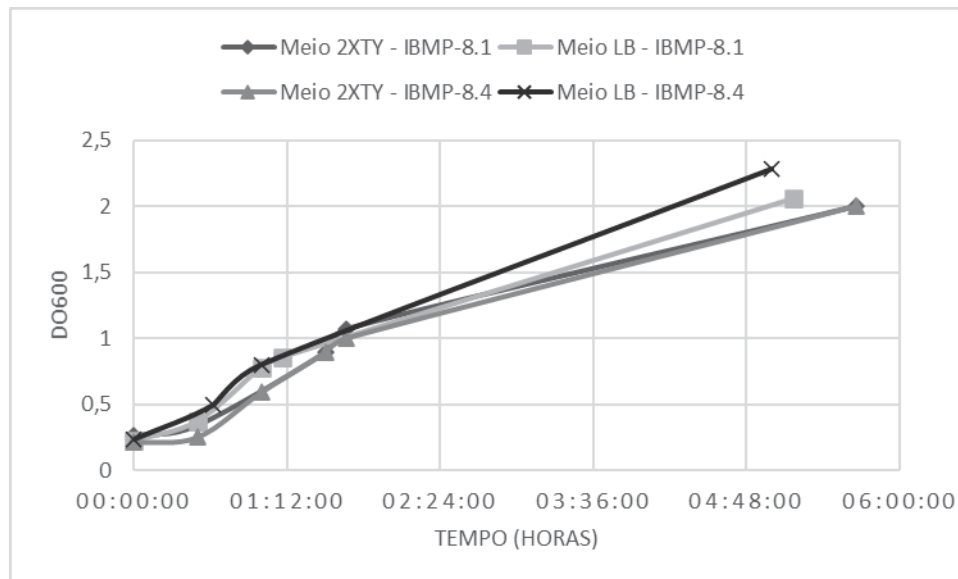
Conforme descrito no item anterior, devido ao baixo rendimento de proteína a partir de cultivos de 25L em meio LB, foi necessário realizar a substituição do meio de cultura. Como otimização de produção o meio de cultura 2xYT foi utilizado desde o pré-inóculo até a multiplicação celular em biorreator. No entanto além do volume de 25 L, manteve-se também o uso de meio definido pois é necessário que sejam mantidos o controle, reprodutibilidade do processo e a simplificação do processamento na purificação.

O objetivo da expansão do inóculo é aumentar o número de células de forma a se alcançar a biomassa necessária que servirá de inóculo para o sistema seguinte. É recomendável a utilização de uma concentração celular mínima de inóculo para diminuir o período de fase lag e também uma concentração celular máxima, para evitar a perda do cultivo devido à falta de nutrientes ou acúmulo de metabólitos tóxicos (ALMEIDA, 2013).

O meio de cultivo 2x YT também é indicado para cepas recombinantes de *E. coli* pois apresenta excelente crescimento bacteriano. O desenvolvimento celular é proporcionado pela presença de peptona e extrato de levedura que fornecem aminoácidos, precursores de nucleotídeos, vitaminas e outros metabólitos que a célula teria que sintetizar. O cloreto de sódio é incluído para tornar o ambiente osmótico adequado (MADURAWA et al., 2000; ROSANO; CECCARELLI, 2014b).

No gráfico abaixo é possível observar que a substituição do meio de cultura não alterou o comportamento ou gerou valores maiores na leitura de DO_{600} , parâmetro utilizado como acompanhamento de processo. Porém o rendimento de biomassa ao final dos processos teve um acréscimo de massa úmida 9,0% no cultivo de expressão da proteína IBMP-8.1 e 7,8% da proteína IBMP-8.4, conforme observado na tabela 2.

Gráfico 2 - RENDIMENTO DE PROTEÍNA PURIFICADA DE ACORDO VOLUME DE CULTIVO NO BIORREATOR WAVE



Fonte: O autor.

Tabela 3 - RENDIMENTO DE MASSA ÚMIDA DE *E. COLI* DE CULTIVO CELULAR REALIZADO EM BIORREATOR WAVE COM VOLUME DE 25 L

Proteína alvo	Rendimento massa úmida (g/L)	
	Meio LB	Meio 2xYT
IBMP-8.1	2,44	2,66
IBMP-8.4	2,32	2,50

Fonte: O autor.

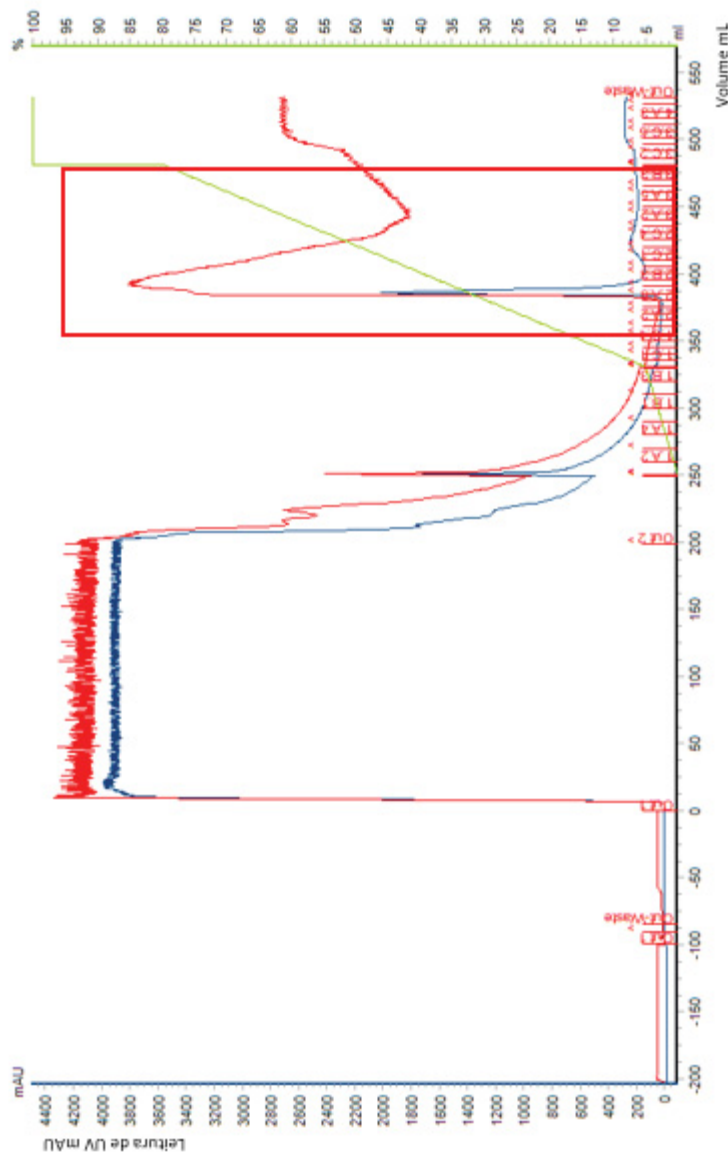
Devido a quantidade de biomassa gerada, para os lotes de 25 L, a massa úmida de cada produção foi fracionada em dois pacotes de armazenamento. Dessa forma cada lote de biomassa gerou a possibilidade da realização de dois processos de purificação.

Durante a realização dos lotes produtivos, a empresa realizou a modernização do parque de equipamentos, ação que viabilizou otimizar e automatizar ainda mais os processos de produção de biomassa e purificação das proteínas. Os novos equipamentos permitem a injeção de amostra automatizada, maior preservação das colunas cromatográficas, elevado fluxo para empacotamento de colunas, refrigeração das frações coletadas durante todo o processo de purificação, versatilidade no volume das frações coletadas, alta segurança de dados,

sensor de oxigênio dissolvido, sensor de massa sensíveis e com maior precisão, controle de gases (CYTIVA, 2022).

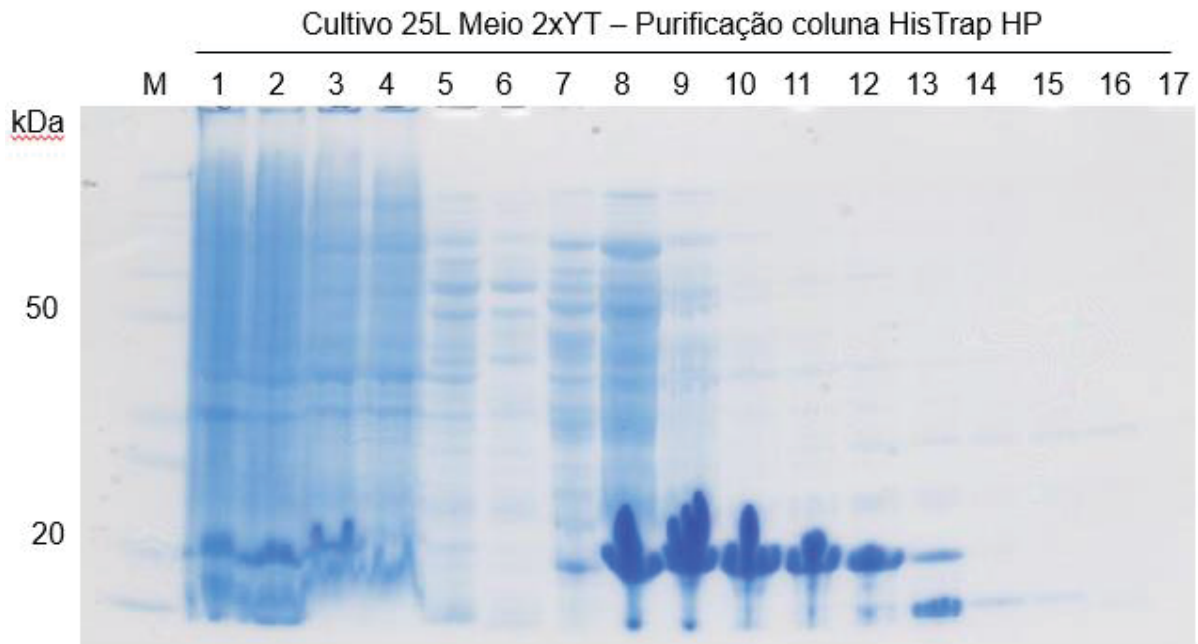
A Figura 17 apresenta a variação de UV 230 nm que indica a eluição da proteína IBMP-8.1 durante o gradiente do tampão eluição. As frações 2B1 até 2C4 possuem a quimera de interesse e foram selecionadas conforme Figura 18. Para o processo de 25 L com meio de cultivo 2xYT foram utilizadas duas colunas de 5 ml conectadas em série.

Figura 17 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5 ML + 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.1 MEIO DE CULTURA 2XYT



Fonte: O autor. Legenda: Linha vermelha: absorbância a 230 nm, Linha azul: absorbância 280 nm, Linha verde: gradiente de tampão de eluição

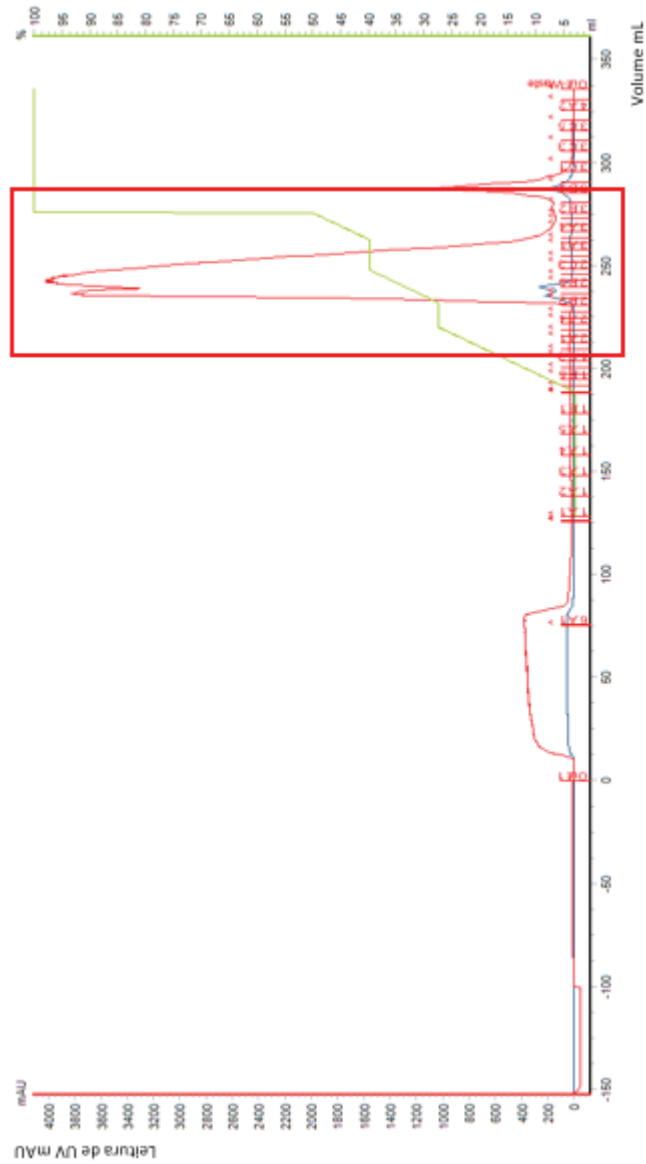
Figura 18 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HISTRAP HP



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Extrato total, **2.** Fração Lisado clarificado, **3.** Lisado clarificado, **4.** Não ligado, **5.** Lavado, **6.** Fração 1A1, **7.** Fração 2A5, **8.** Fração 2B1, **9.** Fração 2B2 **10.** Fração 2B4, **11.** Fração 2C1, **12.** Fração 2C3, **13.** Fração 2C5, **14.** Fração 3A3, **15.** Fração 3A5, **16.** Fração 3B4, **17.** Fração 4A2.

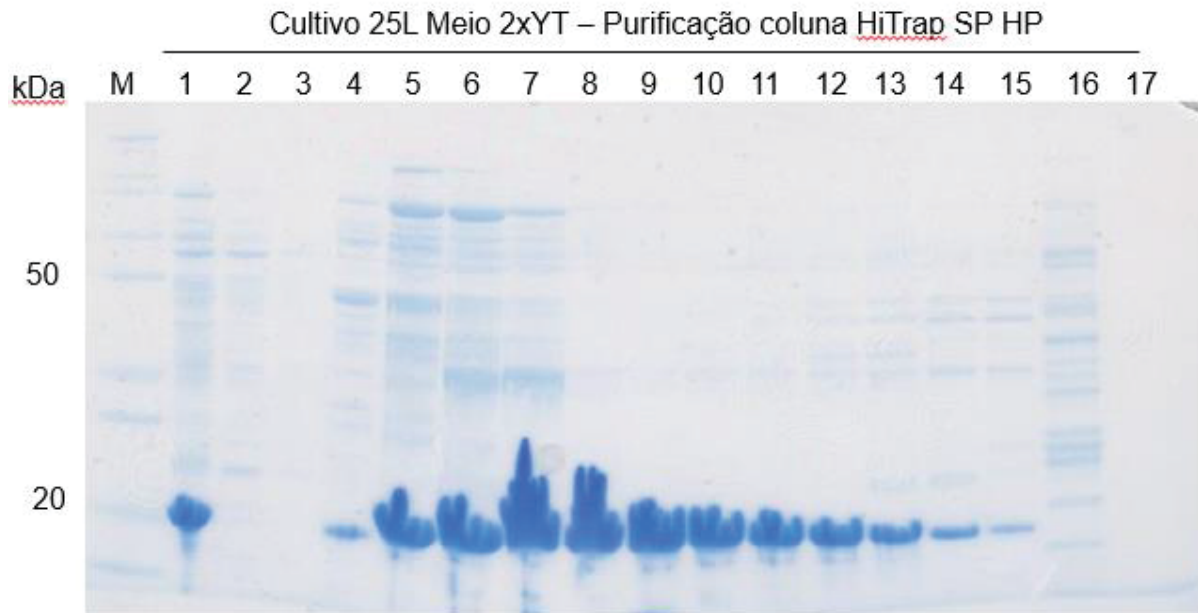
Com o objetivo de otimizar a purificação da proteína IBMP-8.1 para o lote de 2xYT foi realizada alteração na etapa de eluição. O método foi configurado para gradiente 50 % de tampão de eluição, porém com dois degraus para melhor desprendimento da proteína. Ao analisar a Figura 19 identifica-se que houve a purificação da químera IBMP-8.1. Conforme é possível observar na Figura 20, as frações de 2B2 a 3A3 possuem a proteína de interesse, sendo que nas frações 2C1 a 2C4 a químera contém menor presença de contaminantes.

Figura 19 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE TROCA IÔNICA COM COLUNA HITRAP SP HP 5ML PROTEÍNA IBMP-8.1



Fonte: O autor. Legenda: Linha vermelha: absorbância a 230 nm, Linha azul: absorbância 280 nm,
Linha verde: gradiente de tampão de eluição

Figura 20 -ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.1, COLUNA HITRAP SP HP

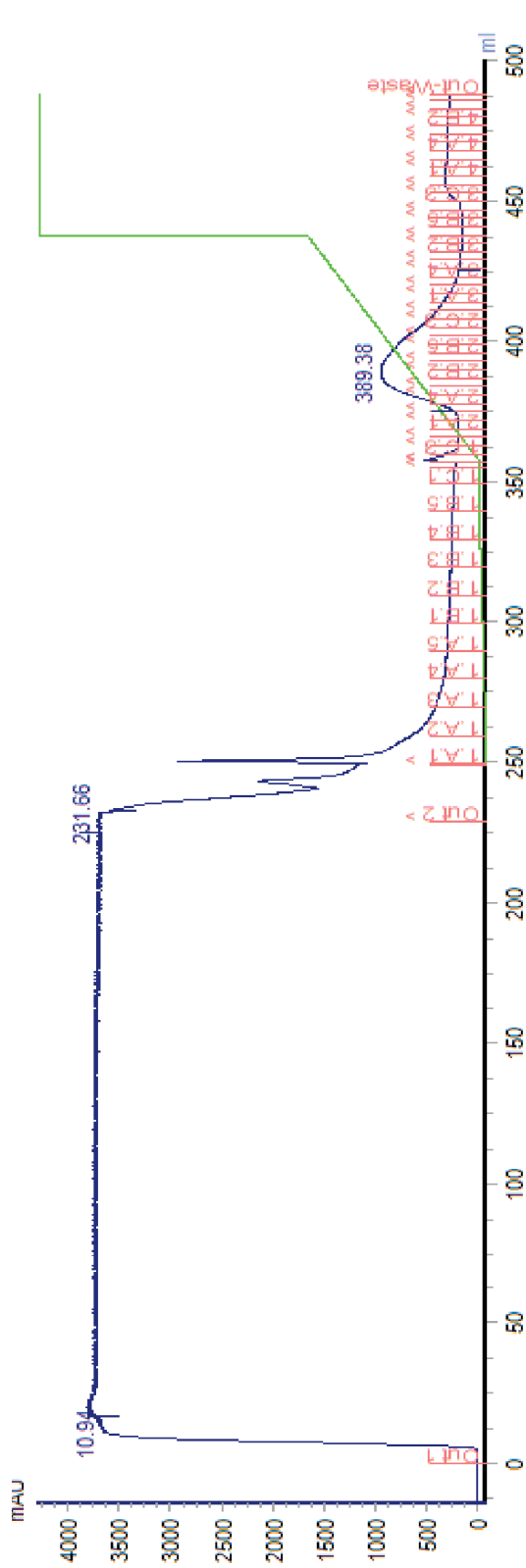


Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Amostra dialisada, **2.** Não ligado, **3.** Lavagem, **4.** Fração 2B2, **5.** Fração 2B3, **6.** Fração 2B4, **7.** Fração 2B5, **8.** Fração 2C1, **9.** Fração 2C2, **10.** Fração 2C3, **11.** Fração 2C4, **12.** Fração 2C5, **13.** Fração 3A1, **14.** Fração 3A2, **15.** Fração 3A3, **16.** Fração 3B4, **17.** Fração vazia.

A coluna HisTrap HP apresenta em seu interior uma matriz de níquel-sepharose, que consiste em *beads* de agarose recobertas com o íon bivalente Ni^{2+} . Ambas as proteínas quiméricas possuem seis resíduos de histidina na posição C-terminal. Desta forma, quando o lisado bacteriano atravessa a matriz da coluna HisTrap HP, as proteínas recombinantes que contêm cauda de histidina ficam retidas na coluna, devido sua afinidade por íons bivalentes (SILVA, 2017). Através de análise do cromatograma é possível observar que o processo de purificação da proteína IBMP-8.1 foi capaz de separar as proteínas de forma a obter o produto final purificado.

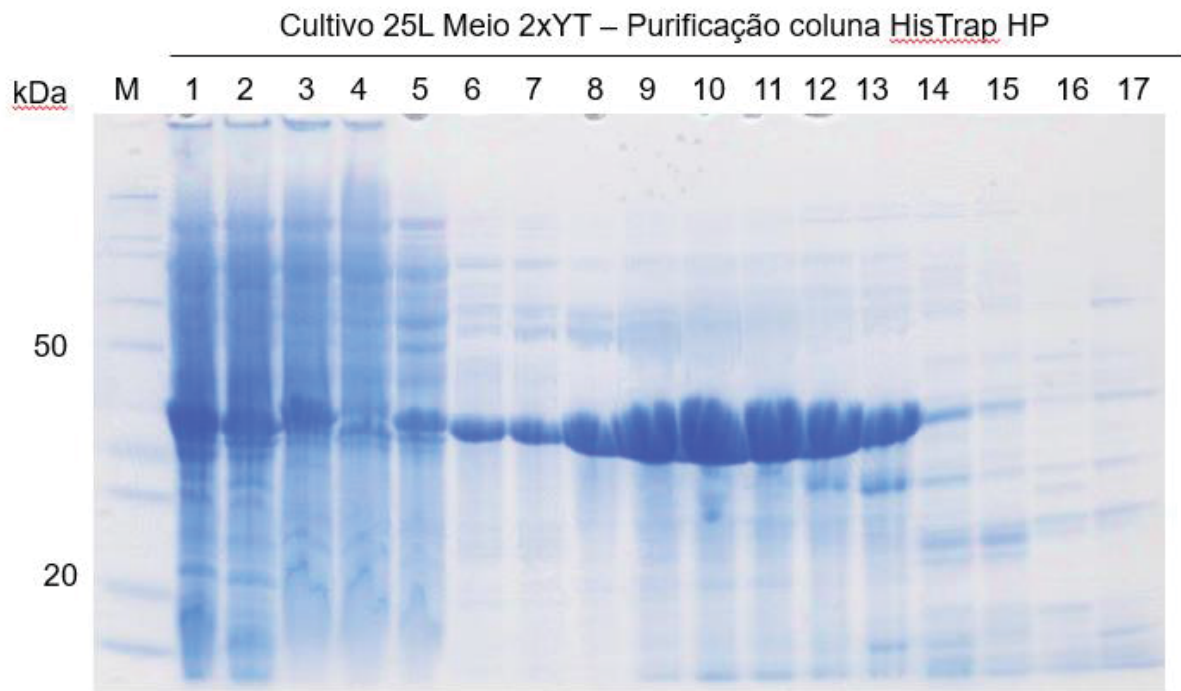
A cromatografia de troca iônica é provavelmente o mais frequente método usado e versátil para fracionamento biomoléculas. Na segunda etapa de purificação utilizando a coluna Hitrap SP HP, o tamanho das partículas e o volume do leito permanecem estáveis, apesar das mudanças na força iônica ou pH, para garantir separações rápidas em altas taxas de fluxo (CYTIVA, 2021b). A modificação do protocolo de eluição de gradiente para degrau aumenta a velocidade e a concentração da proteína alvo (CYTIVA, 2021c).

Figura 21 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HISTRAP HP 5 ML + 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4 MEIO DE CULTURA 2XYT



Fonte: O autor. Legenda: Linha azul: absorvância 280 nm, Linha verde: gradiente de tampão de eluição

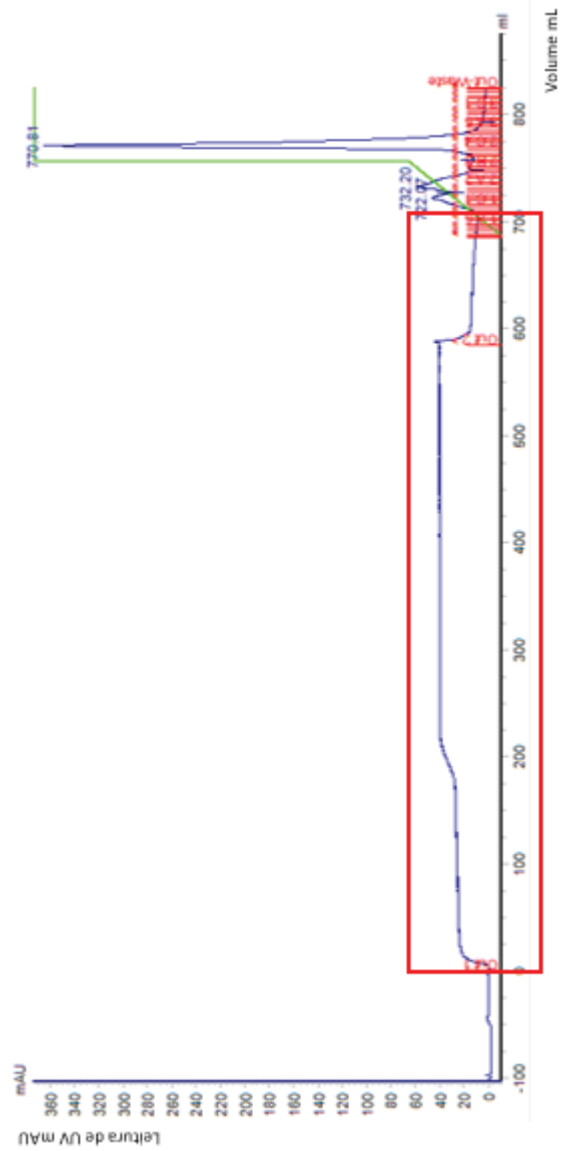
Figura 22 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HISTRAP HP



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Extrato total, **2.** Extrato Clarificado, **3.** Amostra, **4.** Não ligado, **5.** Lavagem, **6.** Fração 1B2, **7.** Fração 1C2, **8.** Fração 2A3, **9.** Fração 2A5, **10.** Fração 2B2, **11.** Fração 2B3, **12.** Fração 2B5, **13.** Fração 2C2, **14.** Fração 2C5, **15.** Fração 3A2, **16.** Fração 3B5, **17.** Fração 3C5.

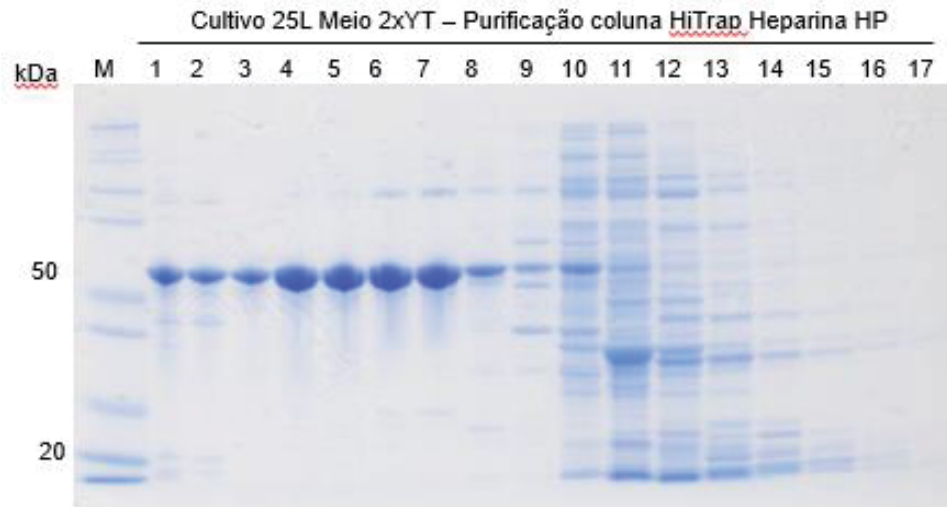
A Figura 21, apresenta a variação de UV 280 nm que indica a eluição da proteína IBMP-8.4 durante o gradiente do tampão eluição. As frações 1B2 até 2C2 possuem a quimera de interesse e foram selecionadas conforme Figura 22 para próxima etapa de purificação. A Figura 23 corresponde ao cromatograma da etapa de purificação por afinidade a Heparina. Na Figura 24 observa-se a presença da proteína desde o carregamento da amostra até a fração 2A3.

Figura 23 - CROMATOGRAMA DA PURIFICAÇÃO DE AFINIDADE COM COLUNA HITRAP HEPARINA HP 5 ML PROTEÍNA IBMP-8.4



Fonte: O autor. Legenda: Linha azul: absorvância 280 nm, Linha verde: gradiente de tampão de eluição.

Figura 24 - ELETROFORESE PURIFICAÇÃO PROTEÍNA IBMP-8.4, COLUNA HITRAP HEPARINA HP



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **1.** Amostra dialisada, **2.** Não ligado, **3.** Lavagem, **4.** Fração 1C2, **5.** Fração 1C3, **6.** Fração 2A2, **7.** Fração 2A3, **8.** Fração 2B3, **9.** Fração 2C2, **10.** Fração 2C3, **11.** Fração 2C4, **12.** Fração 2C5, **13.** Fração 3A1, **14.** Fração 3A2, **15.** Fração 3A3, **16.** Fração 3A4, **17.** Fração 3A5.

Mesmo realizando a ligação de duas colunas de 5 ml, em série a quantidade de proteína IBMP-8.4 presente na amostra foi superior a capacidade de ligação das colunas. Por esse motivo, durante o carregamento da amostra não houve a retenção da quantidade total de proteína. Para finalização do processo foram selecionadas as frações Lavagem até Fração 2A3. A heparina imobilizada tem dois modos principais de interação com as proteínas: como um ligante de afinidade e como trocador de cátions devido seu alto teor de grupos sulfato aniônico. Eluição gradiente com sal é mais utilizada em ambos os casos (CYTIVA, 2020). A capacidade de ligação para coluna utilizada é de 3 mg/ml de resina (CYTIVA, 2020). O processo de purificação possuía mais de 300 mg/ml.

Devido a variedade de parâmetros que causam impactos e possível interação entre eles, o processo de otimização de um produto pode ser um procedimento extenso e moroso. Ao aplicar uma abordagem tradicional de tentativa e erro, realizando a mudança de um parâmetro de cada vez, o parâmetro responsável pelo resultado pode ser identificado. No entanto, esta abordagem requer tempo e grande quantidade de cultivos (CYTIVA, 2021c).

Com o uso do meio de cultura 2xYT em cultivo de 25 L no biorreator Wave 20/50 EHT (Fabricante GE®) e melhorias na cromatografia, o rendimento das

proteínas quiméricas foi extremamente elevado. Para o processo da proteína IBMP-8.1 foi atingido 20 mg/ L de cultura, resultado satisfatório uma vez que, no início do trabalho o rendimento obtido era de 5,25 mg/L de cultivo. Já para a quimera IBMP-8.4 o resultado foi ainda mais expressivo, 28 mg/L, rendimento maior que cinco vezes dos 4,90 mg/L observados no primeiro lote de 5 litros de cultivo. Os valores obtidos, foram não somente melhores que os encontrados nas culturas realizadas com o meio de cultivo LB, mas também foram aproximadamente 6 vezes superiores aos rendimentos registrados nos ensaios de bancada.

Com a otimização houve redução de aproximadamente 75% dos custos de produção, sendo o tempo de processo mantido. Além disso a expressiva quantidade de proteína é capaz de suprir o dobro da demanda atual contratada, fato que reduz a necessidade de quantidade de lotes produzidos e aumenta o tempo de disponibilidade da planta de produção para entrada de novos produtos.

4.5 FINALIZAÇÃO DE PRODUÇÃO

Após a otimização do processo, com a seleção do meio de cultura e volume de batelada para cada antígeno uma amostragem foi enviada ao Controle de Qualidade para testes de aprovação e os documentos foram enviados a Garantia da Qualidade. Amostras das proteínas purificadas permanecem armazenadas para acompanhamento da estabilidade dos produtos.

Dois lotes de biomassa e um de produto final purificado, de cada proteína, estão sob avaliação de estabilidade de longa duração, em parceria com o setor de Controle da Qualidade.

A entrega do dossiê de produção à Garantia da Qualidade é uma etapa das BPF que segundo (PEREIRA et al., 2003), possui responsabilidades relacionadas ao cumprimento das boas práticas de documentação que inclui integridade de dados. Por tanto cabe a Garantia da Qualidade a revisão dos registros antes da liberação dos produtos, armazenamento adequado dos documentos durante o período de retenção, verificação dos processos de validação e qualificação dos equipamentos e sistemas.

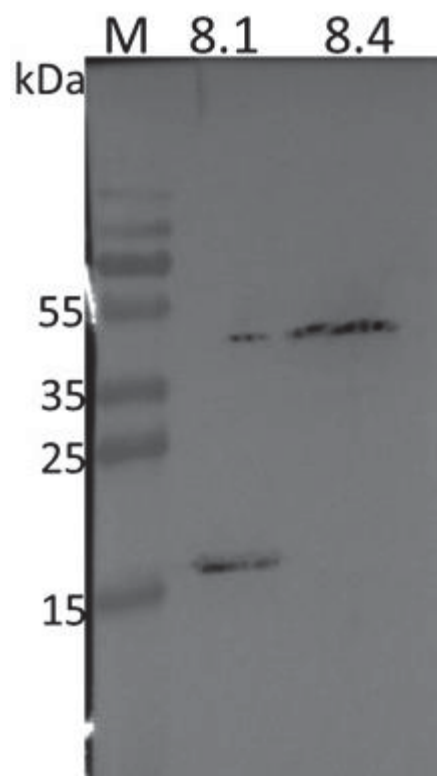
Após liberação as proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 foram enviadas ao cliente para compor a lista de insumos essenciais do kit denominado TR Chagas BIO-MANGUINHOS. Atendendo a RDC nº 36 de 26 de agosto de 2015, seção II, artigo

2º, as quimeras IBMP-8.1 e IBMP-8.4 não necessitam de registro na ANVISA por se tratar de reagentes isolados comercializados como insumos para fabricação de produtos para diagnóstico *in vitro* (ANVISA, 2015).

4.6 WESTERN BLOT

A detecção de sinais, resultou na visualização das bandas de peso molecular das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4, conforme Figura 25. A realização do western blot confirmou de forma qualitativa a funcionalidade das proteínas purificadas a partir de cultivo de 25 L.

Figura 25 – RESULTADO *WESTERN BLOT* PROTEÍNAS IBMP-8.4 E IBMP-8.1 OBTIDAS E PURIFICADAS A PARTIR DE CULTIVO DE *E. COLI* EM 25L COM MEIO 2XYT



Fonte: O autor Legenda: **M.** Marcador Mark 12, **8.1.** Proteína IBMP-8.1 purificada, **8.4.** Proteína IBMP-8.4 purificada.

A produção de antígenos em forma de quimeras reduz a quantidade de execução de processos produtivos. Ao obter variadas regiões antigênicas em uma mesma proteína há também economia para o cliente, uma que vez, não é necessária a compra de diversos reagentes para produção de kit para diagnósticos.

Segundo (HEYDARY-ZARNAGH; HASSANPOUR; RASAEI, 2015) ao utilizar antígenos quiméricos o custo de produção é reduzido pois substitui a expressão individual de proteínas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de aplicação das proteínas quiméricas é fortalecido a partir do estudo que demonstra a estabilidade térmica de longa duração (CELEDON et al., 2021). Além do produto já registrado as proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 estão em avaliação para detecção da Doença de Chagas em triagem em banco de sangue (SANTOS et al., 2022, 2021), cães (LEONY, 2019; LEONY et al., 2019), soro humano (DEL-REI et al., 2019; LIA et al., 2022; SANTOS et al., 2016, 2017b; SILVA et al., 2020), avaliação sem reatividade cruzada com Leishmaniose tegumentar ou visceral americana (CORDEIRO et al., 2020; DALTRO et al., 2019). Os antígenos quiméricos foram aplicados em camundongos para indução de anticorpos e apresentaram resultados eficientes com potencial para desenvolvimento de vacina (MARIA VASCONCELOS QUEIROZ et al., 2021). Por conseguinte, a demanda de produção das proteínas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 tende a aumentar nos próximos anos, à medida que os estudos avancem e necessitem de proteínas produzidas em ambiente controlado e maior quantidade.

O trabalho desenvolvido resultou em otimização de produção em larga escala das proteínas quiméricas IBMP-8.1 e IBMP-8.4 após otimização de processo realizada a partir do uso de meio de cultura 2xYT, modificação do volume de batelada para 25 L, implementação do preparo de pré-inóculo e ajuste na etapa de purificação. O aprimoramento proporcionou expressivo aumento do rendimento da proteína alcançando os valores de 20 mg/L de cultivo para IBMP-8.1 e 28 mg/L de cultivo para IBMP-8.4.

A entrada e produção em ambiente BPF atingindo valores de larga escala de quimeras envolvidas no processo de detecção da Doença de Chagas colocam o Brasil como um país competitivo. A implementação na indústria das duas quimeras representa um grande avanço, pois nacionaliza os reagentes da cadeia produtiva para uma das principais doenças tropicais negligenciadas presentes no país e proporciona redução de custos.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avançar na otimização do crescimento celular em batelada utilizando o novo biorreator tipo onda adquirido pela empresa.
- Realizar o empacotamento de colunas em maior volume para as etapas de purificação das proteínas.
- Reavaliar o método de purificação da proteína IBMP-8.4 para elevar ainda mais o rendimento da proteína.
- Realizar estudo de estabilidade dos produtos em concentração de 2,0 mg/ml armazenados por mais de um ano para avaliar a extensão da validade.
- Utilizando os conhecimentos adquiridos implementar na indústria processos produtivos de larga escala de outras proteínas quiméricas para proporcionar a chegada ao mercado de novos kits diagnósticos.

REFERÊNCIAS

ABRAS, A. et al. Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 3 mar. 2022.

APARECIDA, T. et al. Biosensors and Bioelectronics Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. v. 169, n. June, 2020.

ARAUJO, L. D. C. T. **Otimização do processo de produção de proteínas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* em *Escherichia coli* para uso em diagnóstico de tuberculose**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

ARGOLO, A. M. et al. A Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. n. September 2014, 2008.

BELLÃO, C. **Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2006.

CAMUSSONE, C. et al. Comparison of Recombinant *Trypanosoma cruzi* Peptide Mixtures versus Multiepitope Chimeric Proteins as Sensitizing Antigens for Immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 6, p. 899–905, jun. 2009.

CARMIGNOTTO, G. P.; AZZONI, A. R. On the expression of recombinant Cas9 protein in *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains. **Journal of Biotechnology**, v. 306, p. 62–70, 20 dez. 2019.

CDC. **CDC - DPDx - American Trypanosomiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 20 dez. 2021.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CYTIVA. **Affinity Chromatography - Handbook**. [s.l.: s.n.]. v. 2

DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286–291, 1 jun. 2001.

DALTRO, R. T. et al. Cross-Reactivity Using Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens: Diagnostic Performance in Settings Where Chagas Disease and American

Cutaneous or Visceral Leishmaniasis Are Coendemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 8, 2019.

DALTRO, R. T. **PROTEÍNAS RECOMBINANTES QUIMÉRICAS DO Trypanosoma cruzi COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA PARA IDENTIFICAR A DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA ATRAVÉS DO WESTERN BLOT**. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

DAVI, E. V. **Clonagem de fragmentos dos genes gag e env do HIV-1 e HTLV-1 expressão em Escherichia coli das proteínas gp21,p24 e gp46 do HTLV-1 e imunodeteção**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2015.

DEL-REI, R. P. et al. Detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215623, 18 abr. 2019.

DEMAIN, A. L. Genetics and microbiology of industrial microorganisms - Molecular genetics and industrial microbiology - 30 years of marriage. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 27, p. 352–356, 2001.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, maio 2009.

DOPICO, E. et al. Immune reactivity to Trypanosoma cruzi chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 251, 12 dez. 2019.

DUBENDORF, J. W.; STUDIER, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, n. 1, p. 45–59, 5 maio 1991.

FELICIANO, P. R. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em Leishmania major**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2009.

GADELHA, C. A. G. **A dinâmica do sistema produtivo da saúde: inovação e complexo econômico-industrial**. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2012.

GILBER, S. R. **Reação em cadeia da Polimerase em comparação com o teste de Imunofluorescência indireta (IFI) e Elisa (Enzimaimunoensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.

HERAZO, R. et al. On-site experience of a project to increase access to diagnosis and treatment of Chagas disease in high-risk endemic areas of Colombia. **Acta Tropica**, v. 226, p. 106219, 1 fev. 2022.

IBMP. **Produção Industrial para saúde**. Disponível em:

<<https://www.ibmp.org.br/pt-br/>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

INVITROGEN. **BL21 Star™ (DE3) pLysS One Chemically Competent Cells**, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEE, E. Y. et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli. **PROTEOMICS**, v. 7, n. 17, p. 3143–3153, 1 set. 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição ed. [s.l.: s.n.].

LEONY, L. M. **AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DO TRYPANOSOMA CRUZI NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES LEONARDO MAIA LEONY**. Salvador: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2019.

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in Trypanosoma cruzi populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305–1317, out. 2009.

LIA, N. et al. Double-antigen sandwich ELISA based on chimeric antigens for detection of antibodies to Trypanosoma cruzi in human sera. 2022.

LIN, X.; CHEN, Y.; YAN, J. Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1711–1714, nov. 2008.

MADURAWA, R. D. et al. A Recombinant Lipoprotein Antigen against Lyme Disease Expressed in E. coli: Fermentor Operating Strategies for Improved Yield. **Biotechnology Progress**, v. 16, n. 4, p. 571–576, 4 ago. 2000.

MASSARO, D. C.; REZENDE, D. S.; CAMARGO, L. M. A. Estudo da fauna de triatomíneos e da ocorrência de doença de Chagas em Monte Negro, Rondônia, Brasil. **SciELO Brasil**, v. 11, n. 2, p. 228–268, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), S. DE. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. n. Secretaria de Vigilância em Saúde, p. 43, 2020.

MONTALTI, E. **Doença de Chagas continua negligenciada 111 anos após sua descoberta | Unicamp**. Disponível em: <<https://www.unicamp.br/unicamp/noticias/2020/04/14/doenca-de-chagas-continua-negligenciada-111-anos-apos-sua-descoberta>>. Acesso em: 1 jan. 2022.

NGUYEN, H. H. et al. **Long-term stability and integrity of plasmid-based DNA data storage** *Polymers*, 2018.

OZTURK, E. A. et al. Comparison of the multi-epitope recombinant antigen

DIPOL and hydatid fluid for the diagnosis of patients with cystic echinococcosis. **Acta Tropica**, v. 225, p. 106208, 1 jan. 2022.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 4, n. 11, p. 2411–2423, 1995.

PAIVA, L. B. **ANÁLISE ESTRATÉGICA DA INDÚSTRIA BRASILEIRA DE REAGENTES PARA DIAGNÓSTICO E DAS POTENCIALIDADES DO INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS FRENTE AOS DESAFIOS DA SAÚDE NO BRASIL**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

RATELADE, J. et al. Production of recombinant proteins in the lon-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3803–3807, jun. 2009.

REIS, C.; PIERONI, J. P.; SOUZA, J. O. B. DE S. Biotecnologia para saúde no Brasil. **BNDES Setorial 32**, p. 193–230, 2010.

RODRIGUES, E. S. et al. Chagas Immunochromatographic Rapid Test in the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Wild and Domestic Canids. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 22 fev. 2022.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 172, 2014a.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 17 abr. 2014b.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli* : A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, ago. 2019.

ROSENBERG, A. H. et al. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, v. 56, n. 1, p. 125–135, 1 jan. 1987.

SÁNCHEZ-CAMARGO, C. L. et al. Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2506–2512, jul. 2014.

SANTOS, F. L. N. **CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE POLIANTÍGENOS PARA DETECÇÃO DO TRYPANOSOMA CRUZI NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2016.

SANTOS, F. L. N. et al. Performance Assessment of Four Chimeric *Trypanosoma cruzi* Antigens Based on Antigen-Antibody Detection for Diagnosis of

Chronic Chagas Disease. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0161100, 12 ago. 2016.

SANTOS, F. L. N. et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005433, 8 mar. 2017a.

SANTOS, F. L. N. et al. Performance Assessment of a Trypanosoma cruzi Chimeric Antigen in Multiplex Liquid Microarray Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2934–2945, 1 out. 2017b.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, dez. 2007.

SHILLING, P. J. et al. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 214, 7 dez. 2020.

SILVA, A. L. T. **Identificação de novos antígenos de espécies do gênero Leishmania com potencial uso no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

SILVA, E. D. et al. Development of a New Lateral Flow Assay Based on IBMP-8.1 and IBMP-8.4 Chimeric Antigens to Diagnose Chagas Disease. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–9, 18 ago. 2020.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. **SciELO Brasil**, v. 104, p. 167–180, 2009.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, maio 2005.

THERMO SCIENTIFIC. Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. **Manual**, p. 1–9, 2014.

THERMOFISHER. **Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO, 12 ml**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/66110>>. Acesso em: 24 mar. 2022.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within Trypanosoma cruzi (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, n. 1, p. 12, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 26 mar. 2022.

ANEXO 1 – RDC Nº 665 DE 30 DE MARÇO DE 2022

RESOLUÇÃO RDC Nº 665, DE 30 DE MARÇO DE 2022

Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o art. 15, III e IV, aliado ao art. 7º, III e IV, da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 187, VI, § 1º do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve adotar a seguinte Resolução, conforme deliberado em Reunião Extraordinária - RExtra nº 6, realizada em 30 de março de 2022, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

CAPÍTULO I

DISPOSIÇÕES INICIAIS

Seção I

Objetivo

Art. 1º Esta Resolução dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro, estabelecendo os requisitos que descrevem as BPF para métodos e controles usados no projeto, compras, fabricação, embalagem, rotulagem, armazenamento, distribuição, instalação e assistência técnica aplicáveis à fabricação de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro.

§ 1º Os requisitos de que trata o caput deste artigo se destinam a assegurar que os produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro sejam seguros e eficazes.

§ 2º Esta Resolução incorpora ao ordenamento jurídico nacional a Resolução do Grupo Mercado Comum (GMC) MERCOSUL nº 20, de 17 de novembro de 2011, MERCOSUL/GMC/RES. nº 20/11, "Regulamento Técnico MERCOSUL de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro (revogação das Res. GMC nº 04/95, 38/96, 65/96 e 131/96)".

Seção II

Abrangência

Art. 2º Esta Resolução se aplica a fabricantes, distribuidores, armazenadores e importadores de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro que sejam comercializados no Brasil.

§ 1º Quando os fabricantes de que trata o caput deste artigo concluírem que determinados requisitos estabelecidos nesta Resolução não são aplicáveis a seus processos, estes devem documentar justificativa para tal entendimento.

§ 2º Os distribuidores de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro devem cumprir, minimamente, os seguintes requisitos desta Resolução:

I - Capítulos I, VII e VIII, integralmente;

II - Capítulo II, integralmente, exceto Seção IV;

III - Capítulo III, Seção I;

IV - Capítulo V, artigos 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 e 77, além da Seção IV; e

V - Capítulo VI, integralmente, exceto art. 119.

§ 3º Os armazenadores de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro devem cumprir, minimamente, os seguintes requisitos desta Resolução:

I - Capítulos I e VII, integralmente;

II - Capítulo II, integralmente, exceto Seção IV;

III - Capítulo III, Seção I;

IV - Capítulo V, artigos 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76 e 77; e

V - Capítulo VI, integralmente, exceto art. 119.

§ 4º Os importadores de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso in vitro devem cumprir, minimamente, os seguintes requisitos desta Resolução:

I - Capítulos I, II, VII, VIII e IX integralmente;

II - Capítulo III, Seção I e Seção III;

III - Capítulo IV, art. 63, incisos III, IV e V;

IV - Capítulo V, artigos 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 85, 86 e 87, além das Seções III e IV; e

V - Capítulo VI, integralmente, exceto art. 119.

§ 5º As empresas que exerçam mais de uma atividade deverão cumprir os requisitos específicos definidos para cada atividade.

§ 6º Os requisitos mínimos a serem cumpridos, definidos nos §§ 2º, 3º e 4º deste artigo, são aplicáveis aos distribuidores, armazenadores e importadores, mesmo que o dispositivo mencione apenas a palavra fabricante.

Seção III

Definições

Art. 3º Para efeito desta Resolução, são adotadas as seguintes definições:

I - assistência técnica: manutenção ou reparo de um produto acabado, a fim de devolvê-lo às suas especificações;

II - auditoria de qualidade: um exame estabelecido, sistemático e independente de todo o sistema de qualidade de um fabricante, executado em intervalos regulares e com frequência suficiente para assegurar que, tanto as atividades do sistema de qualidade, quanto seus resultados satisfaçam os procedimentos especificados em seu sistema de qualidade;

III - componente: matéria prima, substância, peça, parte, software, hardware, embalagem, rótulo ou instrução de uso, utilizado durante a fabricação de um produto médico e produto para diagnóstico de uso in vitro, destinado a ser incluído como parte do produto acabado;

IV - dados de entrada de projeto: descrição dos atributos físicos, indicação de uso, desempenho, compatibilidade, segurança, eficácia, ergonomia, usabilidade, informações provenientes de projetos anteriores e resultados do gerenciamento de risco, dentre outros requisitos de um produto médico ou produto para diagnóstico de uso in vitro, que são utilizados como base de seu projeto;

V - dados de saída de projeto: resultado do trabalho em cada fase do projeto e seu resultado final, que quando finalizado, é a base para o registro mestre do produto (RMP);

VI - dano: lesão física ou prejuízo à saúde da pessoa, ou prejuízo à propriedade ou ao meio ambiente;

VII - especificações: requisitos aos quais produtos, componentes, atividades de produção, assistência técnica, serviços, sistema da qualidade ou qualquer outra atividade devem estar conformes;

VIII - estabelecer: definir, documentar por meio escrito ou eletrônico, e implementar;

IX - fabricante: qualquer pessoa que projeta, fabrica, monta ou processa um produto acabado, incluindo aqueles que desempenham funções por contrato de esterilização, rotulagem e embalagem;

X - gerência executiva: alta administração da empresa, responsável por prover recursos e com autoridade para estabelecer ou alterar a política e o sistema da qualidade da empresa;

XI - gerenciamento de risco: aplicação sistemática de políticas, procedimentos e práticas de gerenciamento às tarefas de análise, avaliação, controle e monitoramento de riscos associados a determinado produto ou processo;

XII - lote ou partida: quantidade de um produto elaborado em um ciclo de fabricação ou esterilização, cuja característica essencial é a homogeneidade;

XIII - material de fabricação: material ou substância empregados no processo de fabricação ou para facilitar este processo, incluindo agentes de limpeza, agentes para liberação de moldes, óleos lubrificantes, esterilizantes, ou ainda outros subprodutos do processo de fabricação;

XIV - não conformidade: não cumprimento de requisito previamente especificado;

XV - número de série ou lote: combinação distinta de letras ou números, ou ambos, dos quais pode ser determinado o histórico completo de compras, fabricação, embalagem, rotulagem e distribuição de produtos acabados;

XVI - perigo: fonte potencial de dano;

XVII - política de qualidade: totalidade das intenções e das diretrizes de uma organização com respeito à qualidade, expressas pela gerência executiva;

XVIII - processo especial: qualquer processo cujos resultados não podem ser completamente verificados por inspeções e testes subsequentes;

XIX - produção: todas as operações envolvidas na fabricação de determinado produto, desde o recebimento dos componentes, passando pelo processamento e embalagem, até a obtenção do produto acabado;

XX - produto acabado: qualquer produto ou acessório adequado para uso, embalado e rotulado;

XXI - qualidade: totalidade de aspectos e características que possibilitam a um produto médico ou produto para diagnóstico de uso in vitro atender às exigências de adequação ao uso, incluindo segurança e desempenho;

XXII - reclamação: comunicação por escrito, oral ou eletrônica, relativa à não aceitação da identidade, qualidade, durabilidade, confiabilidade, segurança, eficácia ou do desempenho de um produto;

XXIII - registro: documento físico ou eletrônico, que evidencia dados, fatos, eventos específicos e resultados alcançados em relação ao cumprimento de procedimentos e normas do sistema da qualidade;

XIV - registro histórico do produto: compilação de registros contendo o histórico completo da produção de um produto acabado;

XV - registro histórico do projeto: compilação de documentos contendo o histórico completo do projeto de um produto acabado;

XVI - registro mestre do produto (RMP): compilação de documentos contendo especificações, instruções e procedimentos para obtenção de um produto acabado, bem como para a sua instalação, assistência técnica e manutenção;

XVII - retrabalho: parte ou a totalidade da operação de fabricação destinada a corrigir a não conformidade de um componente, produto intermediário ou produto acabado, de forma que este atenda às especificações definidas no RMP;

XVIII - revisão de projeto: exame documentado, sistemático e completo realizado no decorrer do desenvolvimento do projeto para avaliar a sua adequação ao planejamento e aos objetivos estabelecidos;

XIX - risco: combinação entre probabilidade de ocorrência e severidade de um dano;

XXX - sistema de qualidade: estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, especificações, processos e recursos necessários para gestão da qualidade;

XXXI - validação: confirmação por análise e evidência objetiva que os requisitos definidos para uma determinada finalidade conduzem, de forma consistente, ao resultado esperado;

XXXII - verificação: confirmação por análise e apresentação de evidências objetivas de que os requisitos especificados foram cumpridos, incluindo o processo de examinar os resultados de uma atividade para determinar a conformidade com as especificações estabelecidas; e

XXXIII - vida útil: período de tempo estimado pelo fabricante em que um produto cumpre corretamente as funções para as quais foi projetado.

§ 1º Os procedimentos de que trata o inciso II do caput deste artigo devem ser implementados eficientemente e adequados para alcançar os objetivos do sistema de qualidade.

§ 2º A auditoria de qualidade de que trata o inciso II do caput deste artigo é diferente de outras atividades do sistema de qualidade exigidas por esta Resolução.

§ 3º Com relação a um projeto, a validação de que trata o inciso XXXI do caput deste artigo significa estabelecer e documentar evidências objetivas de que as especificações do produto atendem as necessidades do usuário e o seu uso pretendido.

§ 4º Com relação a um processo, a validação de que trata o inciso XXXI do caput deste artigo significa estabelecer e documentar evidências objetivas de que o processo produzirá consistentemente um resultado que satisfaça as especificações predeterminadas.

CAPÍTULO II

REQUISITOS GERAIS DO SISTEMA DA QUALIDADE

Seção I

Requisitos gerais

Art. 4º Cada fabricante deve estabelecer e manter um sistema de qualidade para assegurar que os requisitos desta Resolução sejam atingidos e que os produtos fabricados sejam seguros, eficazes e adequados ao uso pretendido.

Parágrafo único. Como parte de suas atividades no sistema de qualidade mencionado no caput deste artigo, cada fabricante deve:

I - estabelecer e manter instruções e procedimentos eficazes do sistema de qualidade de acordo com as exigências desta Resolução; e

II - estabelecer procedimentos para atendimento aos dispositivos legais previstos na legislação sanitária vigente.

Seção II

Responsabilidade gerencial

Subseção I

Política de qualidade

Art. 5º A gerência executiva de cada fabricante deve estabelecer sua política e seus objetivos de comprometimento com a qualidade, que devem ser mensuráveis e coerentes com a política estabelecida.

Art. 6º A gerência executiva deve manter a política de qualidade em todos os níveis da organização.

Art. 7º A gerência executiva deve assegurar que a política de qualidade esteja descrita em um manual da qualidade e que seja compreendida por todos os empregados que possam afetar ou influenciar a qualidade de um produto.

Subseção II

Organização e responsabilidades

Art. 8º Cada fabricante deve:

I - estabelecer e manter uma estrutura organizacional adequada, representada por meio de organograma, com pessoal suficiente para assegurar que os produtos sejam fabricados de acordo com os requisitos desta Resolução;

II - estabelecer a responsabilidade, autoridade e inter-relação de todo o pessoal que gerencia, executa e verifica o trabalho relacionado à qualidade, com a independência necessária para execução de suas responsabilidades; e

III - estabelecer funções de verificação, providenciar recursos adequados e designar pessoal treinado para desempenho das atividades de verificação.

Art. 9º A gerência executiva de cada fabricante deve designar um indivíduo da própria gerência executiva, que, independentemente de outras funções, tem autoridade e responsabilidade para:

I - assegurar que os requisitos do sistema de qualidade sejam estabelecidos e mantidos em conformidade com esta Resolução; e

II - relatar o desempenho do sistema de qualidade à gerência executiva para revisão e fornecer informações sobre a melhoria do sistema de qualidade.

Parágrafo único. A designação de que trata o caput deste artigo deve ser documentada.

Subseção III

Revisão gerencial

Art. 10. A gerência executiva de cada fabricante deve avaliar a adequação e a efetividade do sistema de qualidade em intervalos definidos e com frequência suficiente para assegurar que o sistema de qualidade satisfaça as exigências desta Resolução e que cumpra com os objetivos da política de qualidade estabelecida.

Art. 11. A revisão gerencial deve ser conduzida de acordo com os procedimentos de revisão estabelecidos e os resultados de cada revisão do sistema de qualidade devem ser documentados.

Art. 12. Devem ser considerados para revisão gerencial assuntos relacionados a resultados de auditorias, informações pós-comercialização, desempenho de processo e conformidade de produto, situação das ações corretivas

e preventivas, mudanças que possam afetar o sistema da qualidade ou conformidade de produto, requisitos regulamentares, entre outros.

Seção III

Pessoal

Art. 13. Cada fabricante deve contar com pessoal em número suficiente com instrução, experiência, treinamento e prática compatíveis com as atribuições do cargo, de forma a assegurar que todas as atividades previstas nesta Resolução sejam corretamente desempenhadas.

Art. 14. Devem ser mantidas descrições definindo autoridade, responsabilidade e requisitos necessários de todo o pessoal para as diversas tarefas da empresa.

Art. 15. Cada fabricante deve assegurar que todo o pessoal seja treinado para executar adequadamente as tarefas a ele designadas.

§ 1º O treinamento de que trata o caput deste artigo deve ser conduzido de acordo com os procedimentos estabelecidos por pessoas qualificadas para garantir que os colaboradores tenham compreensão adequada de suas funções regulares e dos requisitos desta Resolução aplicáveis às suas funções.

§ 2º Como parte do treinamento de que trata o caput deste artigo, todos os colaboradores devem ser advertidos de defeitos em produtos que podem ocorrer como resultado do desempenho incorreto de suas funções específicas.

§ 3º O treinamento do pessoal deve ser documentado.

Art. 16. Cada fabricante deve assegurar que qualquer consultor que oriente sobre métodos empregados ou controles utilizados para projeto, compras, fabricação, embalagem, rotulagem, armazenamento, instalação ou assistência técnica de produtos, tenha qualificações suficientes - instrução, treinamento e experiência - para aconselhar sobre os assuntos para os quais foi contratado.

Art. 17. A contratação de consultores deve ser conduzida de acordo com os requisitos de controle de compras previstos nesta Resolução.

Seção IV

Gerenciamento de risco

Art. 18. Cada fabricante deve estabelecer e manter um processo contínuo de gerenciamento de risco que envolva todo o ciclo de vida de um produto médico ou produto para diagnóstico de uso in vitro, da concepção à sua descontinuação, para:

- I - identificar os perigos associados;
- II - estimar e avaliar os riscos envolvidos;
- III - controlar os riscos associados; e
- IV - avaliar a efetividade dos controles estabelecidos.

Art. 19. O processo contínuo de gerenciamento de risco deve incluir os seguintes elementos:

- I - análise;
- II - avaliação;
- III - controle; e
- IV - monitoramento do risco.

Art. 20. A gerência executiva da empresa deve designar os profissionais responsáveis, estabelecer a política para determinação dos critérios para aceitabilidade do risco, bem como determinar uma revisão periódica das atividades de gerenciamento de risco, a fim de garantir a adequação e efetividade dessas atividades.

Seção V

Controles de compras

Art. 21. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os componentes, materiais de fabricação e produtos acabados fabricados, processados, rotulados ou embalados por terceiros, ou armazenados por estes sob contrato, estejam em conformidade com as especificações.

Parágrafo único. Cada fabricante deve assegurar que os serviços executados por terceiros mencionados no caput deste artigo estejam em conformidade com as especificações por ele estabelecidas.

Art. 22. Cada fabricante deve estabelecer e manter, de acordo com o impacto na qualidade do produto final, critérios para avaliação de fornecedores, especificando os requisitos, inclusive os requisitos de qualidade, que devem ser cumpridos pelos fornecedores.

Art. 23. Cada fabricante deve avaliar e selecionar potenciais fornecedores, conforme sua capacidade em atender aos requisitos previamente estabelecidos, mantendo registro de fornecedores aprovados.

Parágrafo único. Devem ser mantidos registros da avaliação dos fornecedores, bem como de seus resultados.

Art. 24. Deve ser documentado acordo em que os fornecedores se comprometem a notificar o fabricante de qualquer alteração no produto ou serviço, de modo que o fabricante possa determinar se a alteração afeta a qualidade do produto acabado.

Art. 25. Cada fabricante deve manter registros dos pedidos de compras que descrevam claramente ou que façam referência às especificações, inclusive requisitos de qualidade, para componentes, materiais de fabricação, produtos acabados ou serviços solicitados ou contratados.

Art. 26. Cada fabricante deve revisar e aprovar os documentos de compras antes de sua liberação.

Art. 27. A aprovação dos pedidos de compras, incluindo a data e a assinatura manual ou eletrônica do responsável, deve ser documentada.

CAPÍTULO III

DOCUMENTOS E REGISTROS DA QUALIDADE

Seção I

Requisitos gerais

Art. 28. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de controles de documentos para assegurar que todos os documentos indicados nesta Resolução estejam corretos e adequados para o uso pretendido, e sejam compreendidos por todos que possam afetar ou influenciar a qualidade de um produto.

Art. 29. Cada fabricante deve designar pessoas para avaliar e aprovar todos os documentos estabelecidos nesta Resolução para adequação antes de sua emissão.

Parágrafo único. A aprovação de que trata o caput deste artigo, incluindo data e assinatura manual ou eletrônica do responsável pela aprovação dos documentos, deve ser documentada.

Art. 30. Cada fabricante deve assegurar que todos os documentos estejam atualizados e disponíveis nos locais de aplicação e que todos os documentos desnecessários ou obsoletos sejam retirados de uso, ou protegidos do uso não intencional.

Art. 31. Alterações de especificações, métodos ou procedimentos relativos ao sistema da qualidade devem ser avaliadas, documentadas, revisadas e aprovadas por pessoas, cuja função e nível de responsabilidade sejam equivalentes às que executaram a revisão e a aprovação original.

Art. 32. Cada fabricante deve manter registros de alteração em documentos que devem incluir:

- I - a descrição da alteração;
- II - a identificação dos documentos alterados;
- III - a identificação dos documentos afetados;
- IV - a identificação da pessoa responsável pela alteração;
- V - a data de aprovação da alteração; e
- VI - a data em que a alteração entra em vigor.

Art. 33. Deve ser mantida relação de documentos vigentes, de forma a identificar a situação atual dos documentos e assegurar que estejam em uso apenas documentos atuais e aprovados.

Art. 34. Todos os documentos e registros da qualidade devem ser legíveis e guardados de forma a minimizar danos, prevenir perdas e proporcionar rápida recuperação.

Art. 35. Todos os documentos e registros arquivados digitalmente devem ter cópia de segurança.

Art. 36. Os documentos e registros considerados confidenciais pelo fabricante podem ser assinalados para alertar a autoridade sanitária competente.

Art. 37. Todos os documentos e registros necessários relativos a um produto devem ser mantidos por período de tempo equivalente à vida útil do produto, contado a partir da data de sua distribuição, não podendo em caso algum ser inferior a dois anos.

Seção II

Registro histórico do produto

Art. 38. Cada fabricante deve manter registros históricos dos produtos.

Art. 39. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os registros históricos dos produtos sejam mantidos para cada lote ou série, a fim de demonstrar que os produtos foram fabricados de acordo com o registro mestre do produto e com os requisitos desta Resolução.

Art. 40. O registro histórico do produto deve incluir, ou fazer referência, às seguintes informações:

- I - data de fabricação;
- II - componentes utilizados;
- III - quantidade fabricada;
- IV - resultados de inspeções e testes;
- V - parâmetros de processos especiais;
- VI - quantidade liberada para distribuição;
- VII - rotulagem;
- VIII - identificação do número de série ou lote de produção; e
- IX - liberação final de produto.

Seção III

Registros de inspeções e testes

Art. 41. Cada fabricante deve manter registro dos resultados das inspeções e dos testes estabelecidos, quando estes estiverem diretamente relacionados a atributos de qualidade críticos do produto.

Art. 42. Os registros das inspeções e dos testes estabelecidos devem incluir os critérios de aceitação, os resultados, o equipamento/instrumento usado e a data e assinatura manual ou eletrônica do responsável.

CAPÍTULO IV

CONTROLE DE PROJETO E REGISTRO MESTRE DE PRODUTO

(RMP)

Seção I

Controle de projeto

Art. 43. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de controle do projeto do produto, a fim de assegurar que os requisitos especificados para o projeto sejam obedecidos.

Art. 44. Cada fabricante deve estabelecer e manter planos que descrevam ou referenciem as atividades de projeto e desenvolvimento, bem como as pessoas responsáveis por cada atividade.

§ 1º Os planos de que trata o caput deste artigo devem incluir qualquer interação entre os diversos grupos organizacionais e técnicos que tenham alguma interface com o projeto.

§ 2º Os planos de que trata o caput deste artigo devem ser avaliados, atualizados e aprovados, à medida que o desenvolvimento do projeto progrida.

Art. 45. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para garantir que os requisitos relacionados a um produto estejam apropriados e atendam a sua intenção de uso, incluindo as necessidades do usuário e paciente, e os requisitos legais e regulamentares aplicáveis.

Parágrafo único. Os procedimentos de que trata o caput deste artigo devem incluir um mecanismo que permita que requisitos incompletos, ambíguos ou conflituosos sejam identificados e tratados.

Art. 46. Os dados de entrada de um projeto devem ser documentados, avaliados e aprovados por uma pessoa designada qualificada.

Art. 47. A aprovação dos requisitos do projeto, inclusive a data e a assinatura manual ou eletrônica do responsável pela aprovação, deve ser documentada.

Art. 48. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para a verificação de projeto do produto.

§ 1º A verificação de projeto deve ser executada por pessoa designada e deve assegurar que os dados de saída do projeto satisfaçam aos dados de entrada.

§ 2º Os resultados da verificação de projeto, incluindo a identificação do projeto verificado, os métodos de verificação, a data e o nome da pessoa encarregada da verificação, devem ser documentados no registro histórico do projeto.

Art. 49. Cada fabricante deve definir e documentar os dados de saída de projeto, de maneira a permitir a avaliação da conformidade do projeto aos requisitos estabelecidos como dados de entrada.

§ 1º Os dados de saída de projeto devem satisfazer os requisitos dos dados de entrada, incluir os critérios de aceitação e identificar as características de projeto que são essenciais para o uso pretendido do produto.

§ 2º Os dados de saída de projeto devem ser documentados, revisados e aprovados antes de sua liberação.

Art. 50. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para garantir que as avaliações dos resultados dos projetos sejam planejadas, conduzidas e documentadas nas diversas etapas do desenvolvimento do projeto.

Parágrafo único. Os procedimentos de que trata o caput deste artigo devem garantir que representantes de todas as funções diretamente relacionadas à etapa do projeto que esteja sendo revisada, assim como indivíduos de áreas relacionadas e especialistas necessários estejam envolvidos.

Art. 51. Os resultados da revisão de projeto devem ser documentados no registro histórico do projeto.

Art. 52. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que o projeto do produto esteja corretamente traduzido em especificações de produção.

Art. 53. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimento para validar o projeto do produto.

Art. 54. A validação de projeto deve ser realizada sob condições operacionais pré-determinadas, na produção inicial de lotes ou unidade.

Art. 55. A validação de projeto deve garantir que o produto atenda às necessidades do usuário e à indicação de uso, e deve incluir ensaios dos produtos em condições reais ou simuladas de uso.

Art. 56. A validação de projeto deve incluir a validação de software, quando apropriado.

Art. 57. Os resultados da validação de projeto, incluindo identificação, métodos, data e assinatura manual ou eletrônica dos responsáveis, devem ser documentados no registro histórico do projeto.

Art. 58. Na validação de projeto, devem ser realizados estudos de estabilidade sempre que aplicável.

Art. 59. Cada fabricante deve assegurar que o projeto seja liberado para a produção apenas quando estiver aprovado pelas pessoas designadas para tal pelo fabricante.

§ 1º As pessoas designadas, mencionadas no caput deste artigo, devem revisar todos os registros exigidos para o registro histórico do projeto, a fim de garantir que este esteja completo e que o projeto final esteja compatível com os planos aprovados, antes de sua liberação.

§ 2º A liberação de que trata o caput deste artigo, deve ser documentada, incluindo data e assinatura manual ou eletrônica do responsável.

Art. 60. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para a identificação, documentação, validação, revisão e aprovação das alterações de projeto antes de sua implementação, incluindo uma avaliação dos riscos dentro do processo de gerenciamento de riscos.

Art. 61. Cada fabricante deve estabelecer e manter um registro histórico de projeto para cada produto.

Parágrafo único. O registro histórico de projeto deve conter ou fazer referência a todos os registros necessários para demonstrar que o projeto foi desenvolvido de acordo com o plano de projeto aprovado e os requisitos desta resolução.

Seção II

Registro mestre do produto (RMP)

Art. 62. Cada fabricante deve manter registros mestres dos produtos (RMPs).

Art. 63. O RPM para cada tipo de produto deve incluir ou fazer referência às seguintes informações:

I - especificações do produto, incluindo os respectivos desenhos, composição, formulação, especificações dos componentes, especificações do projeto do software e seus códigos fonte;

II - especificações do processo de produção, incluindo especificações de infraestrutura, equipamentos, métodos e instruções de produção e especificações ambientais de produção;

III - especificações de embalagem e rotulagem, incluindo métodos e processos utilizados;

IV - procedimentos de inspeção e testes, com os respectivos critérios de aceitação; e

V - métodos e procedimentos de instalação, manutenção e assistência técnica.

CAPÍTULO V

CONTROLES DE PROCESSO E PRODUÇÃO

Seção I

Requisitos gerais

Art. 64. Cada fabricante deve projetar, conduzir, controlar e monitorar todos os processos de produção, a fim de assegurar que o produto esteja em conformidade com suas especificações.

Art. 65. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de controle de processo que descrevam os controles de processo necessários para garantir conformidade às especificações do produto.

Parágrafo único. Os controles de processos devem ser estabelecidos em qualquer etapa em que puder ocorrer desvio nas especificações do produto, como resultado do processo de fabricação.

Art. 66. Os controles de processo devem incluir:

I - instruções documentadas, procedimentos padrões de operação e métodos que definam e controlem a forma de produção, instalação e manutenção;

II - monitoramento e controle dos parâmetros de processo;

III - conformidade com normas técnicas, padrões ou códigos de referência; e

IV - instruções para liberação de início de processo.

Art. 67. As instalações da empresa devem ser adequadamente projetadas para:

I - assegurar fluxo adequado de pessoas;

II - propiciar o desempenho de todas as operações; e

III - prevenir trocas ou contaminação dos componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e acabados, e assegurar o correto manuseio desses materiais.

Art. 68. Cada fabricante deve prover condições ambientais adequadas às operações de produção, de forma a prevenir a contaminação ou outros efeitos adversos sobre o produto.

Parágrafo único. Para fins do disposto no caput deste artigo, o correto funcionamento dos sistemas de controles ambientais estabelecidos deve ser monitorado, mantendo-se os registros correspondentes.

Art. 69. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de limpeza e sanitização adequados, bem como uma programação que satisfaça as exigências das especificações do processo de fabricação.

Parágrafo único. Cada fabricante deve assegurar que o pessoal envolvido compreenda os procedimentos de limpeza e sanitização.

Art. 70. Cada fabricante deve assegurar que o pessoal que esteja em contato com o produto ou com seu ambiente esteja limpo, saudável e vestido adequadamente para a atividade a ser desempenhada.

Art. 71. Qualquer pessoa que, por meio de exame médico ou por observação de supervisores, aparente estar em uma condição de saúde que possa afetar o produto, deve ser afastada das operações até que a condição de saúde seja considerada adequada.

Parágrafo único. O pessoal deve ser instruído para que reporte aos supervisores quando estiver em condição de saúde que possa afetar o produto.

Art. 72. Cada fabricante deve limitar o consumo de alimentos e bebidas a locais específicos de forma a não afetar as áreas de produção.

Art. 73. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para evitar a contaminação de equipamentos, componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e acabados por materiais de limpeza e desinfecção, incluindo substâncias perigosas ou contaminantes gerados pelo processo de fabricação.

Art. 74. Deve ser estabelecido um programa de controle de pragas e deve ser garantido que, sempre que forem utilizados agentes químicos, esses agentes não afetem a qualidade do produto.

Art. 75. O tratamento e destinação do lixo, efluentes químicos e subprodutos deve ocorrer de acordo com as legislações vigentes aplicáveis.

Art. 76. Normas de segurança biológica devem ser observadas nos casos em que houver risco biológico.

Art. 77. Cada fabricante deve assegurar o cumprimento às normas aplicáveis relacionadas à saúde dos trabalhadores, incluindo o uso de equipamentos de proteção individual, que sejam compatíveis com os processos de trabalho realizados.

Art. 78. Cada fabricante deve assegurar que todos os equipamentos utilizados no processo de fabricação sejam adequados ao uso pretendido e

corretamente projetados, construídos e instalados para facilitar a manutenção, os ajustes, a limpeza e o uso.

Art. 79. Cada fabricante deve estabelecer e manter um programa para manutenção, ajustes e, quando necessário, limpeza do equipamento, para garantir que todas as especificações de fabricação sejam alcançadas.

Parágrafo único. O programa de manutenção deve estar em local de fácil acesso ao pessoal encarregado da manutenção e do uso do equipamento.

Art. 80. As atividades de manutenção devem ser registradas, com a data de realização e a identificação das pessoas encarregadas.

Art. 81. Cada fabricante deve assegurar que quaisquer tolerâncias aceitáveis ou limitações inerentes sejam afixadas em local visível ou perto do equipamento que necessite de ajustes periódicos, ou estejam facilmente disponíveis ao pessoal encarregado desses ajustes.

Art. 82. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para o uso e a remoção de materiais de fabricação, para garantir que estes materiais sejam removidos do produto ou limitados à uma quantidade especificada que não afete adversamente a qualidade do produto.

Art. 83. Os processos especiais devem ser conduzidos de acordo com os procedimentos e parâmetros estabelecidos para assegurar conformidade às especificações.

Parágrafo único. Os parâmetros críticos dos processos especiais devem ser monitorados e registrados no registro histórico de produto.

Seção II

Controles de embalagem, rotulagem e instruções de uso

Art. 84. Cada fabricante deve estabelecer procedimentos para a embalagem dos produtos de forma a proteger o produto de qualquer alteração, dano ou contaminação durante as etapas de processamento, armazenamento, manuseio e distribuição.

Art. 85. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para garantir a integridade e evitar mistura acidental de rótulos, instruções de uso, materiais de embalagem ou etiquetas identificadoras.

Art. 86. Cada fabricante deve assegurar que os rótulos sejam projetados, impressos e, quando for o caso, aplicados de forma que permaneçam legíveis e aderidos ao produto durante as etapas de processamento, armazenamento, manuseio e uso.

Art. 87. Os rótulos e as instruções de uso não devem ser liberados para uso até que pessoa autorizada tenha examinado sua conformidade quanto às informações contidas nos mesmos.

§ 1º A aprovação dos rótulos e das instruções de uso deve ser documentada no registro histórico do produto, incluindo data, nome e assinatura manual ou eletrônica do responsável.

§ 2º No caso de importadores, a documentação da aprovação de que trata o § 1º deste artigo pode ser registrada em documento próprio em substituição ao registro histórico de produto.

Seção III

Inspeção e testes

Art. 88. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de inspeção, testes, ou outros meios de verificação, de forma a assegurar a conformidade aos requisitos especificados em toda a cadeia de fabricação.

Art. 89. A conformidade aos requisitos especificados deve ser avaliada no recebimento de componentes e materiais de fabricação, assim como, nas etapas intermediárias de produção e na aceitação final do produto acabado.

§ 1º Os resultados das atividades de que trata o caput deste artigo devem ser documentados, incluindo sua conclusão - aceitação ou rejeição.

§ 2º A autoridade e a responsabilidade para realização das atividades de que trata o caput deste artigo devem ser definidas pelo fabricante.

Art. 90. Os componentes e materiais de fabricação recebidos, assim como componentes, produtos intermediários e produtos devolvidos, não devem ser usados ou processados até que seja verificada sua conformidade aos requisitos estabelecidos.

Art. 91. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para retenção de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e produtos devolvidos, até que inspeções, testes, ou outras verificações estabelecidas, tenham sido realizados e documentadas.

Art. 92. Os produtos acabados somente podem ser liberados quando as atividades especificadas no RMP tenham sido completadas e a documentação e os dados associados tenham sido revistos, por pessoa designada, para garantir que todos os critérios de aceitação tenham sido atendidos.

Parágrafo único. A liberação dos produtos acabados deve ser documentada, incluindo a data e assinatura manual ou eletrônica do responsável.

Seção IV

Equipamentos de medição e testes

Art. 93. Cada fabricante deve assegurar que todo o equipamento de medição e testes, incluindo equipamento mecânico, automatizado ou eletrônico, seja adequado para os fins a que se destina e seja capaz de produzir resultados válidos.

Art. 94. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para garantir que os equipamentos de medição e testes sejam rotineiramente calibrados, inspecionados e controlados.

Art. 95. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos de calibração que incluam orientações específicas e limites de precisão e exatidão, assim como prescrições para ações corretivas, quando os limites de precisão e exatidão não forem alcançados.

Art. 96. A calibração deve ser executada por pessoal que tenha instrução, treinamento, prática e experiência necessários.

Art. 97. Os equipamentos de medição e testes devem ser identificados de forma a possibilitar que a situação da calibração seja determinada.

Art. 98. Cada fabricante deve estabelecer e manter padrões de calibração para os equipamentos de medição que sejam rastreáveis aos padrões oficiais nacionais ou internacionais.

Parágrafo único. Quando não houver padrão de calibração aplicável disponível, o fabricante deve estabelecer e manter um padrão próprio.

Art. 99. Cada fabricante deve assegurar que sejam mantidos registros das datas de calibração, das mensurações obtidas, do responsável encarregado desta tarefa e da data seguinte para esta operação.

§ 1º Os registros mencionados no caput deste artigo devem ser mantidos pelo fabricante.

§ 2º Os registros mencionados no caput deste artigo devem estar disponíveis para o pessoal que utiliza o equipamento e para os responsáveis pela sua calibração.

Art. 100. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que o manuseio, a preservação e a guarda de equipamentos de teste, inspeção e medição sejam feitos de forma a preservar sua precisão e adequação ao uso.

Art. 101. Cada fabricante deve proteger as instalações e os equipamentos de inspeção, teste e medição, incluindo hardware e software de teste, de ajustes que possam invalidar a calibração.

Art. 102. Cada fabricante deve estabelecer procedimentos para avaliar o impacto dos resultados de medições anteriores quando constatar não conformidades no equipamento de medição e teste, e o resultado desta avaliação deve ser documentado.

Seção V

Validação

Art. 103. Os processos especiais devem ser validados de acordo com protocolos previamente estabelecidos e os resultados das validações, incluindo a data e identificação do responsável por sua aprovação, devem ser registrados.

Art. 104. Os métodos analíticos, sistemas auxiliares de suporte ao processo ou controle ambiental, sistemas informatizados automatizados e softwares que possam afetar adversamente a qualidade do produto ou o sistema da qualidade devem ser validados.

Art. 105. Cada fabricante deve estabelecer procedimentos para verificar periodicamente seus processos, métodos analíticos, sistemas auxiliares de suporte ao processo ou controle ambiental, sistemas informatizados automatizados e softwares validados e, quando aplicável, estabelecer a frequência para revalidação.

Art. 106. Cada fabricante deve estabelecer procedimento para controle de mudanças com o objetivo de controlar as alterações em sistemas auxiliares, softwares, equipamentos, processos, métodos ou outras alterações que possam influenciar a qualidade dos produtos, incluindo uma avaliação dos riscos dentro do processo de gerenciamento de riscos.

§ 1º O procedimento de que trata o caput deste artigo deve descrever as ações a serem adotadas, incluindo, quando couber, a necessidade de requalificação ou revalidação.

§ 2º As mudanças mencionadas no caput deste artigo devem ser formalmente requisitadas, documentadas e aprovadas antes da implementação.

CAPÍTULO VI

MANUSEIO, ARMAZENAMENTO, DISTRIBUIÇÃO E RASTREABILIDADE

Seção I

Manuseio

Art. 107. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que inversões (trocas), danos, deterioração ou outros efeitos adversos que afetem componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e amostras para controle de qualidade, não ocorram durante qualquer etapa do manuseio.

Art. 108. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para identificar a conformidade de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e produtos acabados, de forma a assegurar que somente aqueles devidamente aprovados sejam utilizados ou distribuídos.

Art. 109. Os procedimentos citados no art. 107 e art. 108 desta Resolução devem assegurar que componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários ou produtos acabados:

I - não sejam utilizados ou distribuídos, quando a qualidade ou a condição de adequado ao uso se deteriorar ao longo do tempo;

II - mais próximos do vencimento sejam distribuídos ou utilizados em primeiro lugar; e

III - não sejam distribuídos ou utilizados, com prazo de validade expirado.

Seção II

Armazenamento e distribuição

Art. 110. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para identificação de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e amostras para controle de qualidade de forma a prevenir inversões (trocas) durante o armazenamento.

Art. 111. Os componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e as amostras para controle de qualidade devem ser armazenados em condições físicas e ambientais que previnam danos,

deterioração ou outros efeitos adversos durante o período em que permaneçam armazenados.

Art. 112. Cada fabricante deve manter registros de distribuição, que incluam ou que façam referência:

I - ao nome e endereço do consignatário;

II - à identificação e quantidade de produtos expedidos, com data de expedição; e

III - a qualquer controle numérico utilizado para rastreabilidade.

Seção III

Identificação, rastreabilidade e não conformidades

Art. 113. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para a identificação de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e produtos acabados durante todas as fases de armazenamento, produção, distribuição e instalação para evitar confusão e para assegurar o correto atendimento dos pedidos.

Art. 114. Cada fabricante deve identificar cada unidade, lote ou partida de produtos com um número de série ou lote e essa identificação deve ser inserida no registro histórico do produto.

Parágrafo único. No caso de distribuidores, armazenadores e importadores, a identificação de que trata o caput deste artigo pode ser registrada em documento próprio em substituição ao registro histórico de produto.

Art. 115. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e produtos devolvidos, que não estejam em conformidade com os requisitos estabelecidos, não sejam utilizados ou instalados inadvertidamente.

Parágrafo único. Os procedimentos de que trata o caput deste artigo devem conter prescrições para a identificação, documentação, avaliação, segregação e disposição acerca de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e produtos acabados não conformes.

Art. 116. A avaliação de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários e produtos acabados não conformes deve incluir a necessidade de investigação e notificação das pessoas e/ou organizações envolvidas na não conformidade.

Parágrafo único. Os resultados das avaliações e eventuais investigações de que trata o caput deste artigo devem ser registrados.

Art. 117. Devem ser definidas a responsabilidade pela revisão e a autoridade para disposição acerca de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e produtos devolvidos não conformes.

Art. 118. O processo de revisão e disposição de componentes, materiais de fabricação, produtos intermediários, produtos acabados e produtos devolvidos não conformes deve estar descrito em procedimento estabelecido.

§ 1º A disposição dos produtos mencionados no caput deste artigo deve ser documentada, devendo ser mantido registro da justificativa e assinatura manual ou eletrônica do(s) responsável(is) pela disposição.

§ 2º Em caso de autorização de uso dos produtos mencionados no caput deste artigo, a decisão deve ser baseada em avaliação de risco tecnicamente justificável.

Art. 119. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para o retrabalho, a reinspeção e a reavaliação dos produtos intermediários ou acabados após o retrabalho, para assegurar que satisfaçam suas especificações originais.

Parágrafo único. As atividades relacionadas a retrabalho e reavaliação dos produtos de que trata o caput deste artigo, incluindo problemas provenientes do retrabalho, devem ser documentadas no registro histórico de produto.

CAPÍTULO VII

AÇÕES CORRETIVAS E PREVENTIVAS

Seção I

Requisitos gerais

Art. 120. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para:

I - analisar processos, operações de trabalho, relatórios de auditoria de qualidade, registros de qualidade, registros de assistência técnica, reclamações, produtos devolvidos e outras fontes de dados de qualidade, de forma a identificar causas existentes e potenciais de não conformidades relacionadas ao produto, processo ou sistema da qualidade;

II - investigar a causa de não conformidades relacionadas ao produto, processo ou sistema da qualidade;

III - identificar e executar as ações necessárias para prevenir a ocorrência, corrigir o ocorrido e prevenir a recorrência de não conformidades;

IV - verificar ou validar a efetividade da ação corretiva e garantir que esta não afeta adversamente o produto;

V - registrar as atividades relacionadas às ações corretivas e preventivas;

VI - assegurar que informações acerca de problemas de qualidade ou produtos não conformes sejam devidamente disseminadas àqueles diretamente envolvidos na manutenção da qualidade do produto ou na prevenção de ocorrência de tais problemas;

VII - submeter informações relevantes acerca de problemas de qualidade identificados e das ações preventivas e corretivas à gerência executiva para conhecimento e acompanhamento, assim como à autoridade sanitária competente, quando aplicável; e

VIII - determinar o recolhimento de produtos e outras ações de campo que forem pertinentes no caso de produtos já distribuídos.

§ 1º A análise de que trata o inciso I deste artigo deve se basear em técnica estatística válida para detecção de problemas de qualidade recorrentes, quando aplicável.

§ 2º Para atendimento ao disposto no inciso IV deste artigo, qualquer alteração realizada, quando aplicável, deve observar procedimentos de controle de alterações e protocolos de validação estabelecidos.

Seção II

Gerenciamento de reclamações

Art. 121. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para receber, examinar, avaliar, investigar e arquivar reclamações, assegurando que:

I - reclamações sejam recebidas, documentadas, examinadas, avaliadas, investigadas e arquivadas por uma unidade formalmente designada;

II - reclamações sejam notificadas à autoridade sanitária competente, quando aplicável;

III - reclamações sejam examinadas para verificar se é necessário conduzir uma investigação;

IV - todas as reclamações envolvendo a possível não conformidade do produto sejam examinadas, avaliadas e investigadas;

V - registros sejam mantidos, quando for conduzida uma investigação, contendo as seguintes informações:

- a) nome do produto;
- b) data do recebimento da reclamação;
- c) qualquer número de controle utilizado;
- d) nome, endereço e telefone do reclamante;
- e) natureza da reclamação; e
- f) data e resultados da investigação incluindo ações tomadas.

§ 1º Quando não for conduzida a investigação citada no inciso III deste artigo, a unidade deve registrar o motivo pelo qual a investigação não foi realizada e o nome dos responsáveis pela decisão de não investigar.

§ 2º Quando qualquer reclamação de que trata o inciso IV deste artigo for relativa a óbito, lesão ou ameaça à saúde pública, esta deve ser imediatamente examinada, avaliada e investigada.

Seção III

Auditoria da qualidade

Art. 122. Cada fabricante deve conduzir e documentar auditorias de qualidade para avaliar a conformidade do sistema da qualidade com os requisitos estabelecidos.

Art. 123. As auditorias de qualidade devem ser conduzidas por pessoas comprovadamente treinadas, de acordo com os procedimentos de auditoria

estabelecidos. mas que não tenham responsabilidade direta pelas matérias que estão sendo objeto da auditoria.

Parágrafo único. Os responsáveis pela condução da auditoria de qualidade não podem ter responsabilidade direta pelas matérias que estão sendo objeto da auditoria.

Art. 124. Os responsáveis pelas áreas auditadas devem ser notificados acerca de não conformidades identificadas.

CAPÍTULO VIII

INSTALAÇÃO E ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Art. 125. Cada fabricante deve estabelecer e manter instruções e procedimentos adequados para a correta instalação dos produtos.

Art. 126. No momento da instalação do produto, pelo fabricante ou pelo seu representante autorizado, deve ser verificado se o produto funciona conforme critérios estabelecidos.

Parágrafo único. Os resultados da verificação de que trata o caput deste artigo devem ser registrados.

Art. 127. Cada fabricante deve assegurar que as instruções de instalação e os procedimentos sejam distribuídos juntamente com o produto, ou que de outra forma estejam disponíveis para o responsável pela instalação do produto.

Art. 128. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os produtos acabados submetidos à assistência técnica pelo fabricante ou seu representante satisfaçam às especificações.

Art. 129. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os registros de assistência técnica sejam mantidos e que contenham:

- I - o produto objeto do serviço;
- II - o número de controle utilizado;
- III - a data da realização do serviço;
- IV - a identificação do prestador do serviço;
- V - a descrição do serviço realizado; e
- VI - os resultados das inspeções e testes para aprovação do serviço.

Art. 130. Cada fabricante deve analisar periodicamente os registros de assistência técnica.

Parágrafo único. Nos casos em que a análise de que trata o caput deste artigo identificar tendências de falha, que representem perigo, ou registros envolvendo óbito ou lesão grave, deve ser iniciada ação corretiva/preventiva segundo os requisitos desta Resolução.

CAPÍTULO IX

TÉCNICAS ESTATÍSTICAS

Art. 131. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para identificar técnicas estatísticas válidas para verificar o desempenho do sistema da qualidade e a capacidade do processo em atender as especificações estabelecidas.

Art. 132. Planos de amostragem devem ser formalizados por escrito e baseados em lógica estatística válida.

Art. 133. Cada fabricante deve estabelecer e manter procedimentos para assegurar que os métodos de amostragem sejam adequados ao uso pretendido e que sejam revisados regularmente.

Art. 134. A revisão dos planos de amostragem deve considerar a ocorrência de não conformidades de produto, relatórios de auditoria de qualidade, reclamações e outros indicadores.

CAPÍTULO X

DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 135. A documentação que comprova o atendimento aos requisitos dispostos nesta Resolução deve estar disponível sempre que solicitada pelos órgãos de vigilância sanitária.

Art. 136. O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

Art. 137. Ficam revogadas:

I - a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 16, de 28 de março de 2013, publicada no Diário Oficial da União nº 61, de 1º de abril de 2013, Seção 1, pág. 75; e

II - a Instrução Normativa - IN nº 8, de 26 de dezembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União nº 252, de 30 de dezembro de 2013, Seção 1, pág. 758.

Art. 138. Esta Resolução entra em vigor em 2 de maio de 2022.