

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLA FRANÇA WOLANSKI DE ALMEIDA

Estudo de um Laboratório Analítico Destinado ao Controle em Processo do Biofármaco Interferon alfa 2b humano recombinante.

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

Rio de Janeiro

2009

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, no Departamento de Vacinas Bacterianas, sob a orientação da Prof^a Dr^a Elezer Monte Blanco Lemes.



INSTITUTO OSWALD
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLA FRANÇA WOLANSKI DE ALMEIDA

**Estudo de um Laboratório Destinado ao Controle em Processo do
Biofármaco Interferon Alfa 2b Humano Recombinante.**

Orientadora Prof^a Dr^a Elezer Monte Blanco Lemes.

Dissertação apresentada e aprovada pela Comissão Examinadora em 22/04/2009.

Profa. Dra. Rosiceli Barreto G. Baetas
Fiocruz
Presidente

Profa. Dra. Cleide Rezende
Universidade Estácio de Sá.

Profa. Dra. Denise Cristina de Souza Matos
Fiocruz / Bio-Manguinhos

Rio de Janeiro

2009

Ao meu pequeno Gabriel e meu
companheiro Rafael, que tanta luz trazem para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao diretor da unidade, Dr. Akira Homma, criador desta oportunidade em nosso espaço de trabalho.

Ao vice-diretor Antônio de Pádua Risolia Barbosa, pelo incentivo que nos move a buscar sempre mais.

A orientadora, Dra. Elezer Monte Blanco Lemes, que acreditou nesta proposta.

A Elaine Maria de Farias Teles, pela oportunidade, confiança, compreensão e auxílio na conclusão deste trabalho.

A amiga Maria do Carmo Medeiros Gonçalves, sempre muito presente discutindo as ideias para o trabalho e sempre com palavras de apoio e incentivo.

A Rita de Cássia Elias Benedetti, pelo apoio e incentivo e do valioso auxílio na busca por referências.

A Darcy Akemi Hokama, sempre com palavras de apoio e incentivo durante a evolução do trabalho.

Aos colegas Ana Maria Pereira de Souza, Tânia Pinheiro Pato Cunha, Jorge Alexandre Silveira da Cunha, Marcos Vinicius de Souza, Wilson Bucker Aguiar Júnior e Felipe Rodrigues da Silva, pelo apoio e paciência nestes dois anos de curso.

A parceira de trabalho Débora Elias de Oliveira, por sua brilhante atuação quando substituta da Divisão.

Ao meu filhote Gabriel Wolanski de Almeida, por compreender minha ausência para concluir este trabalho.

Ao meu marido, Rafael Menegassi de Almeida pela paciência, apoio e auxílio na busca por referências.

Aos meus pais, Alaize França Wolanski e Tadeu Wolanski que sempre com muita paciência e energia me conduziram e auxiliaram em minha educação.

Ao grupo SGQ-Coppe, pelos esclarecimentos, fundamentais para o fechamento da dissertação.

A Andrea Ayrosa Lemos Tavares Ayrosa e Zaira Antunes Prado, pela paciência e carinho com que me receberam no MPTI.

A Gilcelia da Silva Marques, Luciano Agonigi e Rosane Cuber Guimarães pela orientação na busca de referências.

A Rosa Tebicherane, Marli Sidoni, Melissa de Souza Castro e Márcia Denegri Lima pelo carinho e conforto nas horas mais difíceis...

Ao colega Miguel Angel de la O Herrera, pelo auxílio na busca por imagens.

Aos colegas da turma de 2007 do MPTI, pelo constante apoio e auxílio em todos os momentos.

A Rosiceli Baetas, revisora deste trabalho, pelas valiosas contribuições para finalização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

ALBERT EINSTEIN

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Definição de Controle em Processo	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Gestão da qualidade e laboratório de controle em processo	6
2.1.1 Evolução do Sistema da Qualidade	7
2.2 Normas vigentes relacionadas à Gestão da Qualidade para Laboratórios de Controle em Processo	14
2.2.1 Boas Práticas de Fabricação	14
2.2.2 Critérios para Laboratórios de Ensaios Analíticos	15
2.3 Confiabilidade Metrológica	16
2.3.1 Norma ISO 5725	18
2.3.2 Validação de metodologias analíticas	18
2.3.3 Programas interlaboratoriais ou Ensaios de Proficiência (EP)	22
2.4 Ferramentas da Qualidade	25
2.5 Análise de riscos e pontos críticos de controle	28
2.6 O produto Interferon alfa 2b humano recombinante	29
2.6.1 Mecanismo de ação	31
2.6.2 Uso terapêutico dos interferons	32
2.6.3 Obtenção do produto Interferon alfa 2b hu-r	33
2.6.4 Obtenção do microrganismo recombinante	35
2.7 Etapas do processo de produção	38
2.7.1 Banco de Células: Lote Trabalho	40
2.7.2 Fermentação ou Biorreação	40
2.7.3 Recuperação do produto	41
2.7.4 Purificação	44
2.8 Objetivos gerais	46
2.8.1 Objetivos específicos	46

2.8.2	Relevância do estudo	47
3	METODOLOGIA	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Pontos críticos de controle	50
4.2	Métodos Analíticos	56
4.2.1	Estabilidade plasmidial	56
4.2.2	Pureza do cultivo	57
4.2.3	Carga microbiana	57
4.2.4	Teor de endotoxinas	57
4.2.5	Peso molecular e pureza de proteínas por eletroforese	58
4.2.6	Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase reversa (HPLC-RP)	58
4.2.7	Ensaio imunoenzimático (Elisa)	58
4.2.8	Eletroforese capilar	59
4.2.9	Determinação de proteínas totais: Método colorimétrico segundo Lowry:	59
4.2.10	Western Blot	59
4.2.11	Considerações	60
4.3	Modelo gerencial para o laboratório de controle em processo	60
4.3.1	Critério 4.1 – Organização	61
4.3.2	Critério 4.2 – Sistema da Qualidade	62
4.3.3	Critério 4.3 – Controle de documentos	63
4.3.4	Critério 4.4 – Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos	64
4.3.5	Critério 4.5. – Subcontratação de ensaios e calibrações	64
4.3.6	Critério 4.6 – Aquisição de serviços e suprimentos	65
4.3.7	Critério 4.7 – Atendimento ao cliente	66
4.3.8	Critério 4.8 – Reclamações	66
4.3.9	Critérios 4.9, 4.10 e 4.11 – Controle de trabalhos de ensaio não-conforme, ação corretiva e preventiva	67
4.3.10	Critério 4.12 – Controle dos registros	68
4.3.11	Critério 4.13 – Auditorias internas	69
4.3.12	Critério 4.14 – Análises críticas pela gerência	70
4.4	Requisitos técnicos	70
4.4.1	Critério 5.1 – Fatores que influenciam a qualidade das medições	71
4.4.2	Critério 5.2 – Pessoal.	71
4.4.3	Critério 5.3 – Acomodações e condições ambientais (instalações)	78
4.4.4	Critério 5.4 – Métodos de ensaio e validação de métodos	79
4.4.5	Critério 4.5 – Equipamentos	81
4.4.6	Critério 5.6 – Rastreabilidade	83
4.4.7	Critérios 5.7 e 5.8 – Amostragem e manuseio de amostras	84
4.4.8	Critério 5.9 – Garantia da qualidade de resultados de ensaios	85
4.4.9	Critério 5.10 – Apresentação de resultados	88
4.5	Considerações finais	93
5	CONCLUSÕES	94

5.1	Perspectivas futuras	95
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
7	ANEXO	103
7.1	Anexo 1: Procedimento GGLAS 02/17025. Critérios para habilitação de laboratórios analíticos em saúde segundo os princípios da ISO/IEC 17025.	103

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BPF – Boas Práticas de Fabricação
- CEP – Controle Estatístico de Processo
- CIGB – Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia
- CNT BIO – Comissão Nacional Técnica em Biossegurança
- DICPR – Divisão de controle em processo
- Degaq – Departamento de Garantia da Qualidade
- Dibop – Divisão de Boas Práticas
- Diman – Divisão de Manutenção
- DI – Documento Interno
- Dequa – Departamento de Controle da Qualidade
- E. coli* – *Escherichia coli*
- FDA – Food and Drug Administration
- GGLAS – Gerência Geral de Laboratórios Analíticos em Saúde
- HCC – Hepatocarcinoma celular
- HCV – Vírus da hepatite C
- HBV – Vírus da hepatite B
- Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b
- HACCP – Hazard Analysis and critical control points/Análise de risco e pontos críticos de controle
- IFN alfa 2b hu-r – Interferon alfa 2b humano recombinante
- ISO – International Standardization Organization
- ISGF3 (*Interferon Stimulated Response Element*/ elemento de resposta ao Interferon ativado)
- Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- INF tipo I – Interferon tipo I
- Jak-1 – Enzima Janus quinase
- LNM – The LNM Institute of Information Technology
- Lafiq – Laboratório Físico-químico
- Lamev – Laboratório de Metrologia e Validação
- MS – Ministério da Saúde
- MCT – Ministério de Ciência e Tecnologia
- Nist – National Institute of Standards and Technology

NPL – National Physical Laboratory
NBR:ISO/IEC – Norma Brasileira: International Standardization Organization
OIML – International Organization of Legal Metrology (Paris-França).
OOS – Out of specification – fora de especificação
OGM – Organismo geneticamente modificado
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCC – Ponto Crítico de Controle
PNI – Programa Nacional de imunizações
Pinte – Posto de integração avançado para excelência.
PTB – Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB).
PDCA – plan, do, check and act
RDC – Resolução da diretoria colegiada
Reblas – Rede Brasileira de Laboratórios analíticos em saúde
RE – Resolução
Secal – Seção de Calibração
Sevan – Seção de validação de métodos analíticos
TRS – Technical Report Series (Série de Informes Técnicos).
Tyk-2 – tirosina quinase.
VIM – Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Mecanismo de ação do Interferon alfa/beta na célula.....	31
Figura 2.2 – Esquema simplificado da construção de uma molécula recombinante .	37
Figura 2.3 – Fluxograma esquemático do processo para obtenção do IFN alfa 2b hu- r.....	39
Figura 2.4 – Microscopia eletrônica de um cultivo de <i>E.coli</i> com a formação de corpos de inclusão.	43
Figura 4.1– Sequência de perguntas acerca de cada etapa proposta para a produção do IFN alfa 2b hur.....	51
Figura 4.2 - Fluxograma das etapas do processo de produção do INF alfa 2b hu r e seus pontos críticos de controle.....	55
Figura 4.3 – As forças das competências.....	72
Figura 4.4 – Fórmulas para cálculo dos limites de controle superior e inferior.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Normas utilizadas na definição do Controle em Processo	4
Tabela 2.1– Evolução da Qualidade	12
Tabela 2.2 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade	20
Tabela 2.3. - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	21
Tabela 2.4 – Tipos de Programas de Proficiência.....	24
Tabela 4.1 – Pontos críticos de controle e ações sugeridas para o processo produtivo de IFN alfa 2b hur.....	52
Tabela 4.2 – Critérios gerenciais apontados no procedimento GGLAS 02/17025	61
Tabela 4.3– Requisitos técnicos apontados no procedimento GGLAS 02/17025.	71
Tabela 4.4 – Atributos técnicos e comportamentais para o novo laboratório de controle em processo	76
Tabela 4.5– Parâmetros mínimos necessários para avaliação das metodologias analíticas destinadas ao controle em processo do IFN alfa 2b hur	81
Tabela 4.6 – Resumo das propostas dos requisitos gerenciais estabelecidos no Procedimento GGLAS 02/17025 (2001).....	91
Tabela 4.7 – Resumo das propostas para requisitos técnicos estabelecidos no Procedimento GGLAS 02/17025 (2001).....	92

RESUMO

Controle em processo é parte das ações para garantia da qualidade dos produtos a fim de que eles atendam aos requisitos mínimos estabelecidos para seu uso. Os resultados obtidos nos ensaios orientam na tomada de decisões, bem como em ajustes ao processo de produção. Muitas vezes tais resultados são condições imperativas para as etapas subseqüentes. O monitoramento do processo produtivo se dá a partir do estabelecimento dos pontos críticos de controle, que precisam ser verificados a cada lote, pois interferem diretamente na qualidade e rendimentos da produção. Portanto, a confiabilidade e agilidade de resposta são fundamentais para correta tomada de decisão e/ou ajuste. O objetivo deste trabalho é propor um modelo de laboratório de controle em processo nos aspectos gerenciais e principalmente nos aspectos técnicos aplicados ao processo de produção do biofármaco Interferon alfa 2b humano recombinante. Este produto, oferecido no portfólio de Bio-Manguinhos encontra-se em processo de transferência de tecnologia com o Instituto cubano CIGB. Com base nos dados da literatura foram estabelecidas as principais etapas do processo produtivo a para expressão de proteínas heterólogas, em sistema recombinante utilizando-se a bactéria *Escherichia coli*. Os pontos críticos de controle foram estabelecidos utilizando-se a metodologia de análise de riscos *HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)*. Para as análises de controle foram propostas metodologias analíticas que proporcionem a consistência de resultados e que possam garantir a qualidade final do processo de manufatura do produto. O modelo proposto também enfatiza a conduta de ações rotineiras de forma que qualquer desvio possa ser imediatamente identificado e suas causas apuradas além de executar as análises com segurança. Os critérios gerenciais e técnicos abordados foram avaliados criticamente, utilizando-se os procedimentos do sistema de garantia da qualidade vigentes no Instituto, bem como na estrutura do laboratório de controle em processo destinado à vacina contra Hib, que foi adotado como premissa básica, fruto da transferência de tecnologia bem sucedida em Bio-Manguinhos. A proposta elaborada poderá ser utilizada em outros laboratórios destinados ao controle em processo de novos produtos em Bio-Manguinhos e enfatiza os critérios técnicos como condicionais para confiabilidade de medição.

Palavras-chave: Controle em processo; garantia; qualidade; interferon alfa 2b humano recombinante; confiabilidade.

ABSTRACT

In-process control is a part of the actions to guarantee the quality for final products in order to attend the minimum requirements established for their using. The results obtained from analytical assays guide on decision-making as well as production process adjustments. Often, these results are conditioned to the follow the subsequent stages. The process monitoring occurs from the establishment of critical control points to verify in each batch because they determinate product quality and process yield. Therefore, the reliability and speed of response are critical for correct decision-making and adjustment. The objective of this work is to propose a model in process control laboratory in management aspects and especially the technical aspects applied to the production of human recombinant interferon alpha 2b biopharmaceutical, object of this study. Bio-Manguinhos supplies this product in its portfolio, which production technology is being transferred from the CIGB, a Cuban Institution. Based on literature data the main steps were established for a production process of heterologous proteins expressed using a recombinant system with the *Escherichia coli* bacteria. The critical control points were established using the risk assessment methodology HACCP, Hazard analysis Critical Control, HACCP. Analytical methodologies were proposed to improve results consistency and assure the final quality of production process. The proposed model emphasizes the routine actions, so that, any deviation could be immediately identified, their causes verified and activities performed reliably. The management and technical criteria described have been critically evaluated using the Bio-Manguinhos institute quality assurance procedures as well as compared to the structure of the in-process control laboratory for Hib vaccine. This laboratory, adopted as basic premise, resulted from a successful technology transfer in Bio-Manguinhos. The proposal drawn up can be used in other laboratories for in- process control in new products in Bio-Manguinhos and emphasizes the technical criteria for conditional measurement reliability.

Key-words: In-process control; assurance; quality; human recombinant intereron alpha 2b; trueness.

1. Introdução

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), cuja missão é “contribuir para a melhoria dos padrões da saúde pública brasileira, através da pesquisa tecnológica para desenvolvimento de produtos e produção de imunobiológicos, visando atender às demandas geradas pelo quadro epidemiológico mundial e do País” (Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br>. Capturado em: 12 de dezembro de 2008). Possui em seu portfólio vacinas, kits para diagnóstico laboratorial e biofármacos – estes últimos incorporados a partir da assinatura de dois contratos de transferência de tecnologia com institutos cubanos. As vacinas integram o calendário básico de vacinações do Programa Nacional de Imunizações (PNI), um dos maiores produtores no cenário nacional, e atende ao Ministério da Saúde, atualmente. Os biofármacos oferecidos são o Interferon alfa 2b humano recombinante (IFN alfa 2b hu-r) e a Eritropoetina recombinante.

O IFN alfa 2b hu-r é utilizado no tratamento das hepatites crônicas, causadas pelos vírus da hepatite tipos B e C. A patologia pode evoluir, conduzindo a lesões hepáticas tais como fibrose, cirrose e até mesmo hepatocarcinoma celular (HCC). (Trinchet *et al.*, 2007). O Ministério da Saúde disponibiliza tratamento para estes pacientes associado ao fármaco ribavirina, através do Programa de Medicamentos Excepcionais. Este programa tem sido incrementado ao longo dos anos e a lista de medicamentos fornecidos chegou a 92 deles em 2002, quando cerca de 129 mil pacientes receberam tratamento, sendo gastos em torno de R\$ 483 milhões. O custo anual, por paciente, no caso das dez proteínas terapêuticas mais vendidas no mundo, varia entre US\$ 10 e US\$ 53. Como os medicamentos excepcionais caracterizam-se pelo alto custo, os mesmos devem ser, por lei, fornecidos pelo Estado (governos federal e estaduais) aos pacientes.

Por se tratar de uma instituição pública e que visa atender as demandas de saúde da população do país, Bio-Manguinhos incorporou o desafio de disponibilizar

este produto a menores custos, o que possibilita o atendimento a um maior número de pacientes.

(Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/04programa.pdf>.

Capturado em: 13 de fevereiro de 2009).

1.1 Definição de Controle em Processo

O processo produtivo, segundo Slack e colaboradores (2002), é um grupo de atividades realizadas numa sequência lógica com o objetivo de produzir um bem ou um serviço destinado a um grupo específico de clientes.

A qualidade dos produtos e dos processos são os desafios da atualidade para manter a competitividade e a sobrevivência das empresas, portanto, é preciso evidenciar que os produtos gerados estão enquadrados nos parâmetros de qualidade especificados.

O papel do “controle” tem sido objeto de estudo por diferentes ramos da ciência, cada qual com seus interesses peculiares, mas mantendo em comum o objetivo de monitorar e avaliar os eventos realizados e, com isso, viabilizar a adoção de ações corretivas imediatas ou futuras.

O controle em processo como atividade é a essência do gerenciamento da qualidade em todos os níveis hierárquicos da empresa, desde o diretor aos operadores. O primeiro passo no entendimento do controle de processo é a compreensão do relacionamento causa-efeito. Essa compreensão irá criar as pré-condições para que cada empregado da empresa possa assumir suas próprias responsabilidades, criando as bases para o gerenciamento participativo (Campos, 1992).

As responsabilidades do controle em processo vão além de prever os recursos necessários para realização dos ensaios físico-químicos ou microbiológicos. Trata-se de estabelecer uma sistemática de trabalho em que seja possível avaliar os resultados obtidos e monitorar ações tomadas para o ajuste dos processos, com o objetivo de garantir que o produto cumpra as especificações necessárias para sua aprovação. Os resultados precisam ser confiáveis para que a produção programe-se e dê seguimento às demais etapas do processo.

O planejamento das atividades e também dos recursos necessários para sua execução, como, por exemplo, insumos, equipamentos, treinamento e qualificação de pessoal, são fundamentais para o completo cumprimento dos objetivos.

As atividades do controle em processo relacionadas às análises de amostras dos produtos em processo são recolhidas durante as diferentes etapas do processo produtivo. Os resultados, que vem a ser o produto gerado das análises quantitativas ou qualitativas, norteiam a tomada de decisões para que se dê continuidade ao processo de produção. Controle em processo, neste contexto, visa atender a demanda analítica em amostras recolhidas durante o processo produtivo, com o intuito de garantir a qualidade de produtos intermediários e finais dentro das especificações requeridas. Assim, a atividade de controle em processo é fundamental para a garantia da qualidade do produto final e, portanto, faz parte das ações da garantia da qualidade. Assim, agilidade e confiabilidade são as palavras chave do controle em processos (RDC n. 210, 2003).

O controle em processos está atrelado à produção, diferentemente das ações relativas ao Controle da Qualidade, que aceitam ou rejeitam lotes a partir de resultados de ensaios e seus limites de especificação (TRS n. 823, 2003). São previstas também, cartas de controle estatístico de processo, de forma que os desvios sejam prontamente identificados e suas causas apuradas (RDC n. 210, 2003).

As normas técnicas nacionais e internacionais para boas práticas de fabricação orientam quanto ao controle em processo e os pontos críticos de controle. Tais normas foram utilizadas como fonte para este trabalho e, neste contexto, podem-se definir alguns conceitos para o escopo do laboratório de controle em processo. Na tabela 1.1, as normas nacionais e internacionais que relacionam o controle em processo, no âmbito da produção de um medicamento – no caso específico, do biofármaco INF alfa 2b hu-r – encontram-se listadas, incluindo-se as normas técnicas afins.

Tabela 1.1 – Normas utilizadas na definição do Controle em Processo

Assunto	Norma técnica ou legislação	Fonte	Descrição
Boas Práticas de Fabricação	RDC n. 210, 2003	Brasil, Anvisa	Sistema de garantia da Qualidade que trata dos requisitos mínimos para produção e controle de medicamentos e biológicos
	TRS 823, 2001	Genebra, OMS	
	QA7, 2001.	EUA, FDA	Trata dos requisitos para produção e controle de biofármacos
Confiabilidade metrológica	NBR:ISO/IEC 17025, 2005.	Brasil, ABNT	Critérios para acreditação de laboratórios de calibração e ensaios. Norma citada: ISO 5725-1, 1994
	Procedimento GGLAS 02/17025, 2001.	Brasil, Anvisa	Critérios para habilitação de laboratórios analíticos em saúde. Normas citadas: RE 899, 2003, - NBR:ISO/IEC Guia 43, 2005 - ISO 5725-1, 1994
	RE 899, 2003	Brasil, Anvisa	Validação de metodologias analíticas
	NBR:ISO/IEC Guia 43, 2005	Brasil, ABNT	Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais – parte 1, desenvolvimento e operação de programas de ensaio de proficiência
	ISO 5725-1,1994	Genebra, 1994	Acurácia das medidas de métodos e medidas princípios gerais

Fonte: RDC 210, 2003, TRS 823,2001, QA7, 2001, ISO 5725,1994, RE 899, 2003, GGLAS 02/17025, 2001, ISO/IEC Guia 43, 2005, ISO/IEC 17025, 2005.

2 Referencial teórico

A literatura disponível sobre o tema 'controle em processo' é bastante restrita, o que dificultou a análise do estado-da-arte referente a este assunto, pois os mesmos estavam bastante fragmentados e dentro de outros contextos como, por exemplo, estatística, ferramentas da qualidade, confiabilidade metrológica e controle da qualidade.

As Boas Práticas de Fabricação citam a necessidade do controle em processo e fornecem algumas diretrizes, no entanto, não estabelecem critérios rígidos com relação aos laboratórios analíticos destinados ao controle em processo. Portanto, é necessário buscar outras diretrizes para estabelecer um laboratório cuja confiabilidade de medição seja alta e cujo monitoramento dos resultados seja efetivo para os ajustes da produção. A NBR ISO/IEC 17025 foi criada para atender a esta finalidade mais específica. Abordaremos aqui esta norma.

Nas Boas Práticas de Fabricação, o controle em processo é tratado tanto na RDC 210 quanto na TRS 823 como uma ação necessária, porém suas peculiaridades não se encontram descritas. Com relação à estrutura hierárquica, o controle em processo está atrelado à produção, porém há uma tendência de que tais laboratórios façam parte do controle da qualidade. Sob o ponto de vista de agilidade na entrega de resultados, o tratamento do controle atrelado à produção facilita o trâmite de amostras e resultados, além da avaliação conjunta entre produção e qualidade de tais resultados. Os profissionais da área de produção têm sua visão ampliada com relação às operações relacionadas ao processo de produção. Já as questões relativas às metodologias de análise e confiabilidade metrológica, a equipe do controle da qualidade é treinada e capacitada em tais aspectos, além de tratar as amostras relativas a uma linha de produção desde o princípio do processo até a liberação dos produtos concentrados, prontos para as atividades de processamento final. Estas questões não serão tratadas neste trabalho, porém precisam ser avaliadas pela Instituição.

2.1 Gestão da qualidade e laboratório de controle em processo

Várias definições para 'qualidade' são encontradas na literatura e muitos estudiosos do assunto disseminaram seu conceito ao longo dos anos. Qualidade pode ser a conformidade com as exigências, segundo Crosby (1967) citado por Marshall e colaboradores (2006). Qualidade é fazer certo na primeira vez, ou ainda, garantir a satisfação dos consumidores. Montgomery (1985) definiu qualidade como um conjunto de atributos que tornam um bem ou serviço plenamente adequado ao uso para o qual foi concebido. Já Betersfield (1986) agregou à definição anterior que bens ou serviços, além de cumprir as especificações conforme o planejado, atendem ao cliente.

Sistemáticas são adotadas em uma organização com a finalidade de padronizar as ações que visam garantir a qualidade dos produtos. A totalidade de tais ações sistematizadas denomina-se Sistema da Qualidade ou Sistema de Gestão da Qualidade (RDC n. 210, 2003).

Um sistema de gestão da qualidade em uma organização visa estabelecer procedimentos padronizados de planejamento e monitoramento das ações dos diversos processos produtivos, de modo a reduzir custos, aumentar a produtividade, satisfazer as necessidades dos clientes e promover ações de melhoria. As ações de melhoria partem de análises críticas das práticas adotadas na organização de forma a adequá-las e reestruturá-las promovendo o ciclo denominado *PDCA* (Campos, 1992). *PDCA* é a sigla que, em inglês, quer dizer:

Plan = Planejar: coletar e analisar dados, estabelecendo metas e o método utilizado para alcançá-las.

Do = Fazer: Implantar o plano de melhoria, executar as tarefas para o alcance das metas, exatamente como planejado.

Check = Checar: monitorar, mensurar e confirmar resultados, comparando-os com a meta planejada;

Act = Agir ou Ação corretiva: padronizar e aprender lições. Essa etapa consiste em atuar no processo em função dos resultados obtidos. Existem duas formas possíveis de atuação: a) adotar como padrão o plano proposto, caso a meta tenha sido alcançada; b) agir sobre as causas do não-atendimento da meta, caso o plano não tenha sido efetivo.

O Laboratório de controle em processo deve ser estruturado com recursos físicos e humanos para atender a um processo produtivo. Pressupõe que as atribuições, divisão das tarefas e interfaces com as demais unidades estejam definidas. Além disso, estabelece práticas para monitoramento dos resultados gerados a fim de evidenciar não-conformidades e propor ações corretivas em tempo real, de modo que os desvios sejam prontamente identificados e suas causas apuradas (RDC n. 210, 2003).

O controle em processos, portanto, é uma das formas de monitorar os processos produtivos de modo a intervir antes que ocorram não-conformidades. A garantia da qualidade dos processos e produtos baseia-se em um sistema da qualidade que deve ser adotado a fim de padronizar práticas de gestão orientadas para qualidade, além de monitorá-las (RDC n. 210, 2003 e TRS n. 823, 2003).

São elementos básicos no gerenciamento da qualidade:

- Infraestrutura ou sistema da qualidade que permeia a estrutura organizacional, procedimentos, processos e recursos;
- Ações sistemáticas necessárias para garantir confiança adequada ao produto, ou serviço, dados requisitos para qualidade;

Tais sistemáticas padronizadas devem abranger todo o planejamento para execução dos ensaios e também ações voltadas para a melhoria contínua do serviço, buscando a excelência dos resultados.

2.1.1 Evolução do Sistema da Qualidade

A preocupação com a qualidade é conhecida há milênios, entretanto, foi encarada como gerência por volta do final da Segunda Guerra Mundial. Hoje, a percepção sobre qualidade está ampliada, integrando-se com diversas outras áreas do conhecimento humano, em função do tipo de produto gerado e de suas expectativas, exigências dos clientes e do mercado. Há muitas classificações para os diversos períodos da qualidade. Marshall et al. (2002) identifica cinco fases distintas, conforme seguem:

Fase 1 – A fase da Inspeção

A inspeção formal passou a ser necessária com o surgimento da produção em massa e a necessidade de peças intercambiáveis. Frederick Taylor, com a teoria da Administração Científica, segmentou as atividades de inspeção. As linhas de montagem são criadas a partir de Henry Ford, porém a produção tinha custos elevados (Marshall et al. 2006).

Fase 2 – A fase do Controle da Qualidade

As técnicas iniciais de inspeção foram aprimoradas com o uso da estatística. Um marco da nova era, o controle estatístico da qualidade ocorreu com a publicação da obra *Economic control of quality of manufactured product* (Shewart, 1931), que conferiu um caráter científico à prática da busca da qualidade. É neste contexto que se verifica o controle da qualidade no processo produtivo via procedimentos estatísticos (Marshall et al. 2006).

Fase 3 – Controle Total da Qualidade

A terceira fase ganha espaço no final da Segunda Guerra Mundial, com a reconstrução do Japão. Um dos grandes nomes que surgem neste período é de Deming.¹ A filosofia básica de Deming é de que a qualidade e a produtividade aumentam à medida que diminui a variabilidade do processo. Ele enfatiza a necessidade de métodos estatísticos de controle, participação, educação e melhoria objetiva; e preconiza manter o pessoal motivado em todos os níveis da organização, visando a melhoria dos processos e práticas de gestão para atingir a excelência em qualidade (Slack, 2002).

Já em 1954, Juran liderou a passagem para uma nova fase com base nos aspectos tecnológicos da fábrica, em que a preocupação com a qualidade tinha abrangência global da instituição (Marshall et al. 2006). Havia movimento dos trabalhadores visando maior motivação e participação da força de trabalho nas atividades de melhoria da qualidade (Slack, 2002).

¹ Deming, estatístico e especialista em qualidade, foi ao Japão proferir palestras aos líderes industriais tendo em vista a preocupação em reconstruir o país, conquistar novos mercados e melhorar a reputação dos produtos japoneses. A repercussão foi tão expressiva que se criou o prêmio Deming, a partir de 1951 (Garvin, 2002 citado por Marshall et al., 2006).

Fase 4 – Garantia da Qualidade ou Controle Total da Qualidade

A partir de 1955, conceitos do Controle Total da Qualidade (TQC) foram disseminados, pregando-se que a qualidade deveria estar inserida desde a concepção do projeto de desenvolvimento do produto incluindo-se aspectos funcionais e atributos de desempenho com envolvimento de todos os níveis hierárquicos assim como fornecedores e clientes nos processos de melhoria da qualidade objetivando o comprometimento e confiança recíprocos (Marshall et al. 2006).

A noção de Administração da Qualidade Total foi introduzida por Feigenbaum em 1957, por meio da publicação do livro *Total Quality Control*, no qual se define 'qualidade total' como um sistema eficaz integrando desenvolvimento, manutenção e melhoria da qualidade dos vários grupos de uma organização, para minimizar custos e atender plenamente as necessidades do consumidor ou cliente (Slack, 2002).

Fase 5 – Gestão estratégica da qualidade ou Gestão pela Qualidade Total

A Qualidade Total ou Gestão pela Qualidade Total é um conceito trazido à tona a partir da publicação do livro *Quality is free*, por Philip B. Crosby. O trabalho destacou a relação custo x benefício da implementação de programas da qualidade nas organizações. Seu trabalho ainda apresenta o modelo 'zero defeito'.

A Engenharia de Confiabilidade no desenvolvimento da indústria espacial e eletrônica são marcos desta nova era.

O Japão continuava investindo maciçamente e supera o Ocidente outra vez. Kaoru Ishikawa é reconhecido pela criação dos círculos da qualidade e pela criação dos diagramas de causa e efeito. Discutia que as ferramentas usadas pelo controle da qualidade eram demasiadamente complexas e de difícil compreensão, pelo uso de técnicas estatísticas. Os processos estavam sempre sujeitos a especificações e regulamentações rígidas.

Ishikawa percebeu que o sucesso da implementação bem sucedida da TQM (*Total Quality Management* ou Gerenciamento Total da Qualidade) era o trabalhador e os círculos de qualidade eram um veículo importante para realização (Slack, 2002).

O termo TQM foi substituído por Gestão por Excelência e até os dias atuais os conceitos adotados nos estados Unidos são similares. A Gestão pela Excelência, por definição é: "Situação excepcional da gestão e dos resultados obtidos pela

organização alcançada por meio de prática continuada dos fundamentos do modelo sistêmico” (FNQ, 2006).

Dentro dos conceitos da Gestão pela Excelência fortaleceram-se os esforços no desenvolvimento de orientações ao gerenciamento das empresas, por meio de requisitos sobre como a organização deveria ser conduzida de forma sistêmica. A partir de então, identificar e avaliar a eficácia das organizações foi uma consequência natural. Para avaliar a eficácia de uma organização, é necessário um modelo de referência a fim de que seja possível estabelecer padrões de excelência, ou seja, estabelecimento de uma situação ideal ou desejada a partir dos dados coletados na organização (Harrison & Shiron, 1999).

2.1.1.1 A evolução do sistema da qualidade em Bio-Manguinhos

Em Bio-Manguinhos, a partir de sua fundação em 1976, a unidade organizacional Garantia da Qualidade foi formalmente designada na década de 90, com a criação da Assessoria da Qualidade. Nesta ocasião os esforços estavam voltados para o cumprimento da necessidade em se elaborar a documentação da qualidade, os procedimentos operacionais padronizados. Assim, iniciou-se a implantação da Garantia da Qualidade em Bio-Manguinhos. Segundo João Quental, então diretor, a cultura em registrar o passo-a-passo da rotina de produção foi um trabalho exaustivo e demorado (Azevedo et al. 2007).

O Sistema da Qualidade na Unidade baseia-se nas Boas Práticas de Fabricação, adotadas a partir das séries de informes técnicos da Organização Mundial de Saúde (OMS), datados de 1991.

Em busca de melhorias dos padrões de qualidade na unidade iniciou-se o movimento de adotar os padrões das normas ISO série 9000.

A partir de 1995, a OMS iniciou um ciclo de palestras e cursos para capacitar os produtores nos conceitos de validação e certificação. Um grupo da Garantia da Qualidade foi criado com a finalidade de realizar as validações e certificações das áreas limpas, autoclaves e outros equipamentos primordiais para produção de injetáveis. Trata-se do Laboratório de Metrologia e Validação (Lamev) que hoje conta com serviços de calibração de instrumentos de medição e validações de equipamentos.

Com a transferência de tecnologia da vacina contra Hib a partir de 1999, houve melhorias nos métodos de controle de qualidade, supervisão da garantia da qualidade, validações e certificações de equipamentos e processos, refino e adequações na classificação das áreas produtivas. Seguindo os avanços das Agências Regulatórias, possibilitou a Bio-Manguinhos ampliar seus horizontes e buscar a excelência em seus padrões de qualidade.

As equipes formadas tornaram-se capacitadas e treinadas para avaliação rotineira do desempenho dos equipamentos dos processos, e seguem as orientações da área de planejamento dentro do plano mestre de validação para cada linha de produção (Hokama, 2005).

O sistema da qualidade prevê atualmente os Pinte (Posto de integração avançado para excelência), destinados a acompanhar o processo produtivo de forma que as ações inerentes à garantia da qualidade nos processos são feitas de maneira imediata. É prevista uma unidade para os assuntos regulatórios, de maneira a fornecer soluções e cumprir exigências, mantendo-se atualizados às modificações e exigências dos organismos reguladores nacionais ou internacionais.

A tabela 2.1 ilustra os principais acontecimentos no Brasil e no mundo com foco em sistemas da qualidade, e a evolução da qualidade em Bio-Manguinhos.

Tabela 2.1– Evolução da Qualidade

Evolução da Qualidade no Brasil e no Mundo	Evolução da Qualidade em Bio-Manguinhos
1987 – Publicação das normas ISO série 9000, baseadas nas normas BS5750 (<i>British Standard</i>)	1976 – Criação do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Absorção da tecnologia de produção da vacina contra meningite através do Instituto Pasteur – França
1990 – ISO publica guia 25, no qual estão estabelecidos os critérios gerais para competência de laboratórios de inspeção e ensaios	1980 – Absorção das tecnologias para produção de vacina contra Sarampo e Poliomielite com os Institutos Kanonji e Japan Poliomyelitis. Capacitação recursos humanos para produção e controle da qualidade. Implementação de técnicas de controle da qualidade destinadas à vacina contra Febre Amarela.
1991 – Publicação Boas Práticas de Fabricação e procedimentos OMS	1990 – Início da implantação de um Sistema da Qualidade baseado na série de normas ISO 9000
1993 – ABNT traduz e publica a norma técnica ISO guia 25	1998 – Inauguração da planta CPF I atendendo às Boas Práticas de Fabricação
1995 – Capacitação pela OMS dos produtores de vacinas em validação de processos e equipamentos	1999 – Transferência de Tecnologia com a empresa multinacional GSK para produção de Vacina contra Hib. – Padronização dos registros, implementação das práticas de garantia da qualidade preconizadas pela GSK, melhoria nos padrões de trabalho para processamento final. – Reforma na planta de produção para atender às Boas Práticas de Fabricação. – Capacitação de pessoal na área de controle da qualidade, com incorporação de novas metodologias analíticas e investimentos em equipamentos laboratoriais.
	2000 – Certificação pela Anvisa e pré-qualificação pela OMS da linha de produção da vacina contra Febre Amarela. – Início da exportação de vacina contra Febre Amarela.
1999 – Criação formal da Anvisa	2001 - Parceria com Instituto Butantã para oferta da vacina tetravalente (DTP + Hib)

Tabela 2.1 – Evolução da Qualidade (continuação)

Evolução da Qualidade no Brasil e no Mundo	Evolução da Qualidade em Bio-Manguinhos
2001 – Publicação da RDC 134 pela Anvisa que trata das Boas Práticas de Fabricação	2003 – Criação formal da Vice-diretoria de Qualidade
2003 – Substituição da RDC 134 pela RDC 210, Boas Práticas de Fabricação	2004 – Inauguração do Centro de Produção de Antígenos Bacterianos – Criação formal da Divisão de Controle em Processos e produção dos lotes de consistência para estudo clínico – Ápice na exportação do produto Instituto no fornecimento de vacina contra Febre Amarela – exportação do produto
2000 – ABNT publica a norma ISO 17025 em substituição ao guia 25, que trata da acreditação de laboratórios de inspeção e ensaios	2005 – Aprovação do registro sanitário junto a Anvisa para produção nacional da vacina contra Hib
2005 – Nova versão da norma ISO 17025 publicada pela ABNT.	2007 – Re-estruturação do Departamento de Garantia da Qualidade com a criação dos Pinte, e divisões de auditoria, documentação e boas práticas. – Acreditação do Lamev / Secal na norma NBR:ISO/IEC 17025.
2006 – Fiocruz é premiada como Melhor Instituição de Saúde Pública do Mundo, concedido pela <i>World Federation of Public Health Associations</i> .	2008 – Proposta de adequação do laboratório de controle em processos para a vacina contra Hib segundo os critérios do procedimento 02 da GGLAS/ Anvisa.

Fonte: Adaptado de Hokama, DA (2005) e Benedetti, RCE (2007).

2.2 Normas vigentes relacionadas à Gestão da Qualidade para Laboratórios de Controle em Processo

2.2.1 Boas Práticas de Fabricação

Há vários modelos de sistemas de gestão da qualidade padronizados em normas nacionais ou internacionais que estabelecem as diretrizes para assegurar a qualidade do produto ou processo e a plena satisfação dos clientes. Estas estabelecem critérios ou requisitos que são condicionais para a implantação do sistema da qualidade. Tais normas são criadas ou adaptadas a partir de organismos que têm por finalidade fiscalizar as indústrias farmacêuticas. As boas práticas de fabricação são um conjunto de ações preventivas tomadas desde o início da produção de determinado produto, de forma a evitar que ocorram desvios de produção e, se estes ocorrerem, as causas sejam facilmente apuradas e medidas corretivas sejam tomadas. No Brasil há representação da Anvisa como organismo regulatório e de inspeção para a produção e controle da qualidade dos produtos farmacêuticos e biológicos.

O cumprimento dos critérios estabelecidos nas resoluções é compulsório para o funcionamento da organização e o conseqüente fornecimento dos produtos ao consumo. No caso dos medicamentos, biológicos e ou produtos biotecnológicos, a Anvisa aprovou, em agosto de 2003, a RDC n. 210 que trata das Boas Práticas de Fabricação. Trata-se de um sistema da qualidade voltado para ações de produção e controle da qualidade de medicamentos. O cumprimento das práticas é monitorado por meio de inspeções anuais promovidas pela Anvisa nos locais de produção.

O organismo europeu que trata das questões regulatórias dos produtos biológicos é a Organização Mundial de Saúde (OMS). As normas e diretrizes publicadas por este organismo são adotadas mundialmente incluindo-se o Brasil, através da Anvisa. As publicações são denominadas 'séries de informes técnicos' TRS (*Technical Report Series*) e tratam das ações para produção e controle da qualidade dos produtos biológicos. As boas práticas de fabricação são tratadas na TRS n. 823.

Nos Estados Unidos, a agência regulatória *Food and Drug Administration* (FDA) adota as normas de Boas Práticas de Fabricação. É denominada *current Good Manufacturing Practices (cGMP)*, publicada na parte 21 do Código Federal de

Regulamentação (CFR part 21). O Guia QA7 (2001), assim como as normas estabelecidas pela Anvisa, o FDA não prevê neste guia recomendações para segurança dos operadores ou do meio ambiente. A Lei Nacional de Biossegurança (2005) deve ser seguida no caso da produção do interferon nas instalações de Bio-Manguinhos. Trata também de esclarecer a condição hierárquica do controle em processo estar vinculado à produção e não ao controle da qualidade, além de estabelecer algumas de suas atribuições. Orienta a localização física do laboratório de controle em processo junto à área de produção. Ainda indica que não há necessidade de autorização prévia do controle da qualidade para realizar os ajustes necessários para assegurar a qualidade do produto, ou seja, há independência entre o controle da qualidade e a produção e controle em processo.

O documento divide-se em 19 seções que tratam desde o gerenciamento da qualidade até assuntos mais específicos relacionados à produção.

2.2.2 Critérios para Laboratórios de Ensaios Analíticos

As diretrizes vigentes para um laboratório analítico de excelência são encontradas nas publicações ISO (Van der Wiele et al. 2000).

A série ISO 9000 forma um conjunto de padrões mundiais que estabelece exigências para os sistemas de administração da qualidade de organizações. Muitos países possuem seus próprios padrões de qualidade baseados na norma ISO, muitas vezes são versões com conteúdo idêntico (Slack et al. 2002).

O propósito da ISO é desenvolver e promover normas e padrões mundiais que traduzam o consenso dos diferentes países do mundo de forma a facilitar o comércio internacional. A ISO tem 136 países-membros, em que o Brasil é representado pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

A norma ISO destinada a laboratórios analíticos é codificada como NBR: ISO/IEC 17025. O sistema da qualidade preconizado por estes critérios confere ao laboratório analítico um alto grau de rastreabilidade e confiabilidade metrológica. Os aspectos gerenciais e de organização do laboratório analítico norteiam as ações de organização e de avaliação crítica, todo sistema da qualidade e das atividades técnicas do laboratório. Assim, torna-se possível a tomada de ações padronizadas,

monitoramento das ações e sua efetividade. Como o laboratório em questão está voltado para a produção, a sistematização das ações torna-se mais rápida.

2.2.2.1 NBR: ISO/IEC 17025

Esta norma, publicada pela ABNT, discrimina os requisitos gerenciais e técnicos necessários para que o laboratório analítico possa ser confiável.

A Anvisa, em seu sítio na internet, sugere que os laboratórios analíticos adotem o sistema de gestão com base na norma NBR ISO/IEC 17025 (2005), que estabelece requisitos gerenciais e técnicos para a implementação de sistema de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração. Desta forma, através da Gerência Geral de Laboratórios Analíticos em Saúde (GGLAS) publicou o procedimento 02/17025. Como órgão de inspeção foi estabelecida a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (Reblas) com a finalidade de habilitar os laboratórios analíticos e verificar o cumprimento dos requisitos no procedimento 02/17025. Os laboratórios analíticos sofrem inspeções e, se todos os requisitos forem devidamente cumpridos, o laboratório é habilitado pela Anvisa, passando a pertencer a Reblas como laboratório de referência para os parâmetros que foram inspecionados (Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos.htm>. Capturado em: 13 de fevereiro de 2009).

Ao seguir esta recomendação, os laboratórios de controle em processo adotam práticas de trabalho com objetivo de gerar resultados analíticos confiáveis. Este sistema de gestão da qualidade, destinado aos laboratórios de análises, preveem condições mínimas de infraestrutura além de padronizar os procedimentos que influenciam na qualidade dos resultados gerados (Procedimento 02/17025 GGLAS, 2001).

2.3 Confiabilidade Metrológica

A confiabilidade dos resultados analíticos obtidos pelo controle em processos é fundamental para a sequência do procedimento do processo produtivo. As incertezas de uma medição analítica precisam estar definidas para nortear a produção. Resultados não confiáveis trazem um alto risco na tomada incorreta de

decisão, o que acarreta em altos custos para produção ou sérias consequências à saúde (Taverniers et al. 2004).

Não existe uma medição perfeita. O erro analítico é o resultado de análise individual entre o resultado e o valor real de um mensurando e constitui um valor único (Taverniers et al. 2004). Os erros não podem ser eliminados completamente, mas podem ser delimitados.

Há dois grandes grupos em que se classificam os erros. Erros sistemáticos e erros aleatórios. Os sistemáticos, ou tendências são calculados a partir de uma série de medições analíticas que reproduzem as mesmas condições laboratoriais. Eles têm sido minimizados sistematicamente com a adoção das práticas de calibração de instrumentos de medição. Já os erros aleatórios são provenientes dos analistas, do preparo das amostras, curvas de calibração, *softwares* de cálculos não validados.

Para que se conheçam os erros inerentes à metodologia, realizam-se os ensaios e é efetuada uma avaliação estatística. A este trabalho se dá o nome de 'validação analítica' e é uma das exigências das Boas Práticas de Fabricação, bem como da norma NBR: ISO/IEC 17025. Outra maneira de se avaliar a eficiência de um laboratório analítico é dispor de amostras conhecidas e enviar ao laboratório para determinação analítica. Assim observam-se os resultados obtidos e evidencia-se o grau de assertividade deste laboratório. A esta prática se denomina 'ensaio de proficiência'.

As estimativas de incerteza conferem resultados com maior aceitação estatística e menor erro, com o objetivo de aproximar a medida a um valor verdadeiro (Palmigiani, 2005). A incerteza de medição é, por definição, "desvio padrão (ou múltiplo dele) ou a metade de um intervalo correspondente a um nível aceitável de confiança estabelecido, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando" (VIM, 2007).

A incerteza pode ser expressa pelo desvio padrão das medidas realizadas, também denominada 'incerteza padrão', ou pela incerteza expandida. A incerteza expandida leva em consideração o fator de cobertura, representado pela letra *k*. Quando *k* assume o valor numérico equivalente a 2, podemos afirmar, grosseiramente, que é equivalente à metade do comprimento de um intervalo com 95% de confiança (Hund et al. 2001). Isto significa dizer que há probabilidade, com 95% de confiança, de que o valor medido está incluído na incerteza expandida. (Taverniers et al. 2004). A estimativa de incerteza de medição analítica está atrelada

às condições operacionais da metodologia aplicada associada à incerteza da medição dos equipamentos empregados durante a medida.

O procedimento 02/17025 referencia a norma ISO 5725 para confiabilidade e incerteza de medição.

2.3.1 Norma ISO 5725

A norma ISO 5725 trata da confiabilidade e incerteza de medição. Esta norma se divide em seis partes e estas exemplificam os cálculos para estimar a incerteza da medição analítica. Cada parte trata de um parâmetro específico.

- Parte 1: Princípios gerais e definições;
- Parte 2: Métodos básicos para determinação de repetitividade e reprodutibilidade de um método de medição padrão;
- Parte 3: Medidas intermediárias de precisão de um método de medição padrão;
- Parte 4: Métodos básicos para determinação de exatidão de um método de medição padrão;
- Parte 5: Métodos alternativos para a determinação da precisão de um método de medição padrão.
- Parte 6: Acurácia (acurácia e precisão) de métodos de medição e resultados: Uso em práticas de valores de acurácia.

2.3.2 Validação de metodologias analíticas

Métodos analíticos são aplicados para transformação de informações de dados químicos em informações ao usuário ou clientes. Quimiometria é a disciplina que usa matemática, estatística e outros métodos formais para desenhar ou selecionar ótimos procedimentos de medição e experimentos para extrair um máximo de informações de dados químicos. Através dela pode ser obtido o máximo de informações (McDowall et al. 1992).

Em geral, as técnicas estatísticas são utilizadas para determinar se as variações são aleatórias e fazem parte do processo, ou se tais variações possuem

uma causa específica. Muitos profissionais estatísticos contribuíram na evolução da qualidade, conforme citado no Histórico da Qualidade, o que demonstra a importância na aplicação de técnicas estatísticas no processo produtivo. O uso de tais técnicas possibilita a inclusão de melhorias na qualidade (Ryan, 2000).

O objetivo da validação analítica é demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito (Brito et al. 2003).

As validações analíticas são exigências tanto das Boas Práticas de Fabricação (RDC n.210, 2003) quanto da NBR:ISO/IEC 17025 (2005) e portanto devem ser cumpridas. A Anvisa estabeleceu os critérios para validação de métodos analíticos através da RE 899 (2003). A Eurachem é uma rede de organizações europeias que tem por objetivo estabelecer um sistema para rastreabilidade internacional de determinações químicas e promover boas práticas de qualidade, também provê um fórum para a discussão de problemas comuns e a promoção de desenvolvimento tanto para assuntos técnicos quanto para assuntos políticos. Tem foco em química analítica e qualidade.

A definição de validação, segundo RDC 210 (2003) é: “um processo para definir uma exigência analítica e confirmar que método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”.

Vale destacar que as resoluções são instrumentos com poder de lei, isto é, são compulsórios. Já os guias são sugestivos e recomendados. As validações analíticas são exigências tanto das Boas Práticas de Fabricação (RDC n. 210, 2003) quanto da NBR:ISO/IEC 17025 (2005) e, portanto, devem ser cumpridas. A Anvisa estabeleceu os critérios para validação de métodos analíticos por meio da RE 899 (2003).

Muitos são os organismos que definem os ensaios necessários para a validação da metodologia analítica. FDA, OMS, Eurachem definem a validação analítica e orientam quanto aos cálculos realizados para assegurar a validação de métodos analíticos (Ribani et al. 2004). A Anvisa determina os ensaios necessários à validação dos métodos analíticos por meio da Resolução n. 899. Os parâmetros solicitados para avaliação seguem relacionados, a saber:

- Especificidade/Seletividade;
- Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho;
- Linearidade;

- Limite de detecção (LD);
- Limite de quantificação (LQ);
- Sensibilidade (inclinação da curva);
- Exatidão e tendência;
- Precisão:
 - Repetitividade;
 - Precisão intermediária;
- Reprodutibilidade;
- Robustez;
- Incerteza de medição.

A avaliação dependerá da finalidade do ensaio, e os divide em quatro classes. Estabeleceram-se para cada categoria os parâmetros necessários para validar o método.

A tabela 2.2 relaciona as categorias dos métodos classificados conforme a finalidade de cada teste. Os parâmetros propostos e tipos de ensaios necessários encontram-se relacionados na tabela 2.3.

Tabela 2.2 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
III	Testes de <i>performance</i> (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: RE 899, 2003.

Tabela 2.3. - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.
Fonte: RE 899 (2003).

Cada um dos parâmetros avaliados possui um princípio relatado a seguir.

- A especificidade ou seletividade do método significa que o método é capaz de medir um composto na presença de outros componentes tais como impureza, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos deve-se ter atenção para garantir a pureza dos picos.
- Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.
- Intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Em geral, é determinado após o estudo da linearidade do método.
- Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da mesma amostra. A avaliação é expressa em desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. Não se admitem valores superiores a 5%.
 - Repetitividade: Determinações realizadas pelo mesmo analista com os mesmos instrumentos e equipamentos em curto período de tempo.

- Precisão intermediária: Determinações da mesma amostra realizada por analistas diferentes, em dias diferentes ou com instrumentos e equipamentos diferentes.
- Reprodutibilidade: Determinações de mesma amostra em laboratórios diferentes.
- Exatidão, ou seja, a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.
- Limite de quantificação ou: a menor quantidade de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão. É estabelecido a partir da relação entre o desvio padrão da média e a inclinação da curva.
- Robustez: Capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

Nos métodos analíticos espectrofotométricos devem ser consideradas as variações de pH das soluções, temperatura e diferentes fabricantes de solventes. Para a cromatografia líquida é necessário avaliar a variação de pH na fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel.

As metodologias analíticas adotadas pelo controle em processo precisam ser avaliadas quanto à eficiência e rapidez de resposta. Os métodos usados na determinação da qualidade dos produtos em processo precisam ser rápidos, reprodutíveis e repetitivos. As metodologias analíticas já publicadas possuem a vantagem de terem sido exaustivamente testadas, segundo critérios preestabelecidos para validação das mesmas.

2.3.3 Programas interlaboratoriais ou Ensaio de Proficiência (EP)

Além da validação analítica, outra maneira de se evidenciar a atuação do laboratório analítico se dá por meio de ensaios de proficiência (EP) que são parte das ações de garantia da qualidade em constante evolução. Estes ensaios de proficiência ou interlaboratoriais são recomendados para assegurar a validade dos resultados obtidos. Agregam-se também o uso de materiais de referência a fim de garantir a confiabilidade dos resultados além dos requisitos para gerenciamento da

qualidade do laboratório analítico (Seleção, uso e interpretação de programas de ensaios de proficiência, EP, por laboratórios, 2006).

Os programas interlaboratoriais são propostos para realização de ensaios de proficiência e para identificar desvios ocorridos nas determinações analíticas. Utilizam ferramentas estatísticas para avaliação dos resultados obtidos em diversos laboratórios a partir de uma mesma amostra (Chi, 2004).

Segundo o guia 'Seleção, uso e interpretação de programas de EP por laboratórios' (2006), os programas de proficiência recebem uma classificação. De acordo com a norma NBR: ISO IEC 17025 (2005), os ensaios de proficiência são comparativos interlaboratoriais com os seguintes objetivos:

- Avaliar o desempenho do laboratório;
- Identificar não-conformidades e propor ações corretivas efetivas;
- Estabelecer a equivalência de novos métodos com aqueles anteriormente preconizados;
- Monitorar metodologias empregadas a partir dos resultados gerados;
- Gerar confiança aos clientes;
- Identificar diferenças interlaboratoriais.

Os programas de proficiência estimulam o bom desempenho dos participantes e fornece aos laboratórios um meio objetivo de avaliar e demonstrar a confiabilidade dos dados que estejam produzindo. Tais ensaios aplicam-se com o objetivo de se avaliar a habilidade do laboratório em realizar ensaios de forma competente (ISO/ GUIA 43, 2005). Permite também concluir qual a exatidão dos resultados gerados no laboratório, qual seu desempenho no presente comparando-se aos resultados passados, assim como a posição do laboratório em meio aos seus semelhantes. A participação em EP é capaz de identificar melhorias em relação ao tempo e se o sistema é eficaz e possibilita um incremento na qualidade das atividades realizadas. O procedimento 02/17025 cita a norma internacional ISO Guia 43 como uma fonte a ser seguida para utilização de ensaios de proficiência.

2.3.3.1 Norma ISO guia 43

A norma ISO guia 43 (2005), está dividida em duas partes. A primeira estabelece os requisitos para desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência, publicados. A parte 2 enumera os critérios para seleção e uso de programas de ensaios de proficiência por organismos de credenciamento de laboratórios. Há alguns tipos de ensaios interlaboratoriais que não se destinam a avaliar a capacidade técnica do laboratório, porém possuem igual importância no que diz respeito à qualidade dos serviços prestados.

A implantação de ensaios de proficiência depende do tipo de amostras e de ensaios que se deseja avaliar. Há muitos tipos de programas para ensaios de proficiência. Alguns são abertos a qualquer laboratório com custo anual e outros são fechados, nos quais a participação é realizada mediante convite. Os tipos de programas interlaboratoriais podem ser classificados conforme explicitado na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Tipos de Programas de Proficiência

Tipo de Programa	Objetivo	Categorias
Competência	Medir a competência de um grupo de laboratórios na determinação de uma análise específica.	Quando a amostra passa de um laboratório a outro. Pode também passar por um laboratório central antes de ser encaminhada ao próximo a fim de detectar-se alguma alteração na mesma.
Competência	Medir a competência de laboratório em relação a um tipo de análise em diversas matrizes.	Amostras aleatórias selecionadas a partir de um suprimento homogêneo a granel são distribuídas entre vários laboratórios. Quando a amostra é subdividida em diversas partes e cada parte é encaminhada a um laboratório
Estudo de proficiência	Avaliação contínua da competência técnica.	Não se aplica
Estudo colaborativo	Validação de um método específico.	Não se aplica
Estudo de certificação	Estabelecimento da melhor estimativa do valor real do analito em um material de referência.	Não se aplica
Estudo cooperativo (também conhecido como ensaio circular ou exercício de repetição alternada)	Avaliação de um laboratório em uma base individual.	Não se aplica

Fonte: Adaptação Procedimento GGLAS 02/43, 2006.

2.4 Ferramentas da Qualidade

Várias metodologias são utilizadas com o intuito de monitorar os processos a partir de resultados analíticos. Tais métodos são conhecidos como ferramentas da qualidade.

Segundo Lins (1993), as ferramentas básicas da qualidade são métodos padronizados usados na identificação e análise de problemas com o objetivo de definir, mensurar, analisar e propor soluções. As ferramentas da qualidade são usadas para avaliação dos problemas dentro da unidade de produção da organização. É necessário aplicar técnicas estatísticas e ferramentas da qualidade para evidenciar a confiança nos resultados inerentes aos processos de produção.

As ferramentas da qualidade úteis no controle em processo estão listadas a seguir:

- Fluxogramas

São representações gráficas de um processo ou metodologia. Sua grande vantagem é identificar com clareza os passos da execução do processo, ou seja, tornar visível o método.

- Folhas de verificação

São quadros para registro de números de ocorrência de determinado evento. Tais folhas são muito utilizadas para acompanhamento de processo de produção a fim de evidenciar o número de não-conformidades, relacionando-as aos turnos de trabalho, tempo de operação de equipamentos, entre outros.

- Gráfico de Pareto

Tem aspecto de um gráfico de barras; recebeu esta denominação devido ao seu inventor Vilfredo Pareto que identificou as seguintes características em problemas socioeconômicos: poucas causas principais influíam fortemente no problema; havia um grande número de causas triviais, pouco importantes, que influíam marginalmente no problema. Ao construir o gráfico, são relacionados os eventos e suas causas. Esta análise de causas pode ser desdobrada, até que se encontre a causa primária. Esta técnica denomina-se 'estratificação'.

- Diagramas de causa e efeito

Também são denominados 'diagramas de Ishikawa', em reconhecimento ao engenheiro japonês Kaoru Ishikawa, que desenvolveu esta ferramenta. Também se denomina diagrama 'espinha de peixe', devido ao formato gráfico que apresenta. Esta ferramenta permite desdobrar os problemas em suas prováveis causas, até os níveis de detalhamento adequados à solução dos mesmos. Para montar-se o gráfico é necessária análise crítica e reflexão com base em dados coletados, a fim de se que sejam julgados procedentes ou improcedentes.

- Gráficos de tendência

Trata-se de um gráfico simples no qual o comportamento de uma variável é descrito ao longo do tempo – ou outra variável de referência. De maneira simples, é possível evidenciar se há tendência em um processo, ou se ele se mantém dentro dos limites previamente estabelecidos.

- Histograma

Representação gráfica dos valores, de uma determinada característica, agrupados por faixas, ou intervalos de classes. Permite a visualização de certos fenômenos com a noção da frequência em que ocorrem.

- Carta de Controle

São também chamadas de 'Cartas de Shewart', devido ao estatístico norte-americano Walter Shewart, que as desenvolveu na década de 1920, com intuito de acompanhar os processos de produção.

O controle estatístico de processos (CEP) é a base para o estudo do comportamento do processo. É utilizado na determinação da capacidade do processo e monitoramento dos rendimentos e permitem avaliar a consistência de produção (TRS n. 823, 2003). O CEP é uma ferramenta da qualidade para resolução de problemas, útil na verificação da estabilidade e na melhoria da capacidade dos processos através da redução da sua variabilidade (Alencar, *et al.*, 2007). Para que o processo esteja sob controle é necessário identificar as causas dos desvios

significativos de comportamento, e resolvê-las sempre que possível. Esta ferramenta é usada para uma pesquisa estatística que tem por base a necessidade de resolver problemas na prática (Hoerl, 2000).

O CEP é expresso por gráficos ou cartas de controle em sequência temporal com linhas de decisão adicionadas (limites superior e inferior de controle). Estas linhas servem para determinar se um processo está ou não sob controle (Ryan, 2002).

O controle em processo foi o fundamento para o desenvolvimento das técnicas para controle estatístico da qualidade. A partir das etapas que compõem a realização de um trabalho incluindo seu fluxo, insumos, atividades realizadas e produtos gerados, é possível obter-se muitas informações sistematizadas e perceber pontos críticos, oportunidades de melhoria e, principalmente, as variações e flutuações devidas a causas anormais ou específicas, intrínsecas à natureza do processo. O gráfico de controle em processo, ou carta de controle, é o instrumento mais simples para documentar e avaliar a ocorrência destes eventos e, a partir daí, implantar mudanças e assegurar os padrões de qualidade desejados a partir do monitoramento dos resultados e a estabilidade do processo (Alencar *et al.*, 2007).

A implantação do controle estatístico de processos, sugerido por Lins (1993) segue o seguinte procedimento:

1. Identificação das características críticas da qualidade – atributos ou variáveis;
2. Mensuração das características em um período de tempo;
3. Cálculo das médias e amplitude da amostra;
4. Construção de gráfico de controle;
 - 4.1. Gráfico global integrado para variáveis (Shewart);
 - 4.2. Gráfico global para atributos (Pareto);
5. Verificar se o processo está sob controle;
6. Correção das causas dos desvios.

Cada variável é representada em um gráfico, no qual estão estabelecidos limites de controle superior e inferior, podendo-se também representar os limites de especificação. A partir destes dados, calcula-se a capacidade de processo. Cálculos estatísticos são realizados com base na tolerância de uma característica (Ribeiro et

al. 2001). O processo é dito 'capaz' se for possível produzir resultados dentro da faixa de tolerância. Assim, tornam-se necessários alguns conceitos de precisão e acurácia ou exatidão. Um processo preciso resulta em pouca variabilidade ou dispersão, mas não necessariamente é acurado. Um processo acurado, por outro lado, atende na média o valor nominal, porém, se não for preciso, a sua alta variabilidade poderá produzir resultados inadequados, o que pode ocasionar a rejeição de lotes (Lins, 1993).

- Gráfico de dispersão

Permite visualizar a correlação entre duas grandezas. A correlação pode ser inexistente, quando não é possível identificar qualquer tipo de correlação, estabelecer uma correlação linear, não linear ou apresentar-se em outros tipos de distribuição.

- *Brainstorming*

É uma técnica (literalmente, 'tempestade de pensamentos') que visa instigar um grupo de pessoas a dar suas ideias sobre determinado tema, aleatoriamente. Desta contribuição espontânea podem sair soluções criativas e inovadoras para os problemas, rompendo com paradigmas estabelecidos. O clima de envolvimento e motivação gerado pelo *brainstorming* assegura melhor qualidade nas decisões tomadas pelo grupo, maior comprometimento com a ação e um sentimento de responsabilidade compartilhado por todos.

2.5 Análise de riscos e pontos críticos de controle

Um método destinado à análise de riscos e estabelecimento de pontos críticos de controle é preconizado pelo FDA para ser utilizado na indústria alimentícia a fim de avaliar o risco potencial com alimentos e as medidas de controle daqueles riscos identificados. Trata-se do HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), ou Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle/PCC (TRS n. 908, 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ird/bghaccp.htm>. Capturado em: 12 de dezembro de 2008). A OMS estabeleceu a aplicação desta metodologia para produção de fármacos, como por exemplo, substâncias biologicamente ativas. Os

riscos são definidos como substâncias biológicas, químicas ou fatores físicos que possam causar injúria se não forem controlados. A avaliação de cada etapa do processo produtivo pode ser controlada, evitando-se ou eliminando-se, desta maneira, os riscos quanto à qualidade do produto. Quando não é possível eliminar os riscos, a avaliação poderá reduzi-los a um nível aceitável.

A metodologia de avaliação de riscos, HACCP, baseia-se em sete princípios, a saber:

1. Conduzir à análise de riscos;
2. Determinar os pontos críticos de controle;
3. Estabelecer níveis de aceitação e seus limites;
4. Estabelecer sistema de monitoramento dos PCC;
5. Estabelecer a ação corretiva a ser tomada quando o monitoramento indicar que um ponto HACCP em particular não está sob controle;
6. Estabelecer procedimentos para verificar que o sistema HACCP é eficaz;
7. Estabelecer a documentação a respeito dos procedimentos e manter registros apropriados para estes princípios e suas aplicações.

2.6 O produto Interferon alfa 2b humano recombinante

Para falarmos do processo produtivo do biofármaco IFN alfa 2b hur, temos de nos remeter a citocina interferon, suas classificação e propriedades terapêuticas. Os interferons (IFN), foram descobertos através de pesquisas realizadas por Isaacs e Lindenmann (1957). São moléculas de natureza proteica, pertencente à família das citocinas, produzidas por células dendríticas, linfócitos T ativados, macrófagos e células *Natural Killer* (NK), em resposta à instalação de vírus ou bactérias no organismo (Samuel, 2001).

Conforme o avanço das pesquisas, novas informações desvendavam a existência de uma ampla variedade de IFN humanos e estes foram classificados não somente de acordo com a célula de origem, mas também de acordo com suas diferenças físico-químicas, antigênicas e de ação biológica. De acordo com a célula de origem, os IFN são classificados em dois tipos (I e II). Aqueles classificados como do tipo I possuem homologia estrutural e são decodificados por genes em um único

cluster no cromossomo 9. Em humanos, nos IFN tipo I agrupam-se os subtipos alfa (INF- α), secretados por todas as células infectadas por vírus, incluindo-se células dendríticas e fagócitos mononucleares, INF beta (INF- β) produzido por fibroblastos. Além destes, o tipo I ainda engloba os interferons epsolon, kapa e ômega, representados respectivamente pelas letras gregas, INF- ϵ , INF- κ e INF- ω (Abbas et al. 2007). No tipo II encontra-se classificado o interferon gama, também conhecido por IFN imunológicos, secretado por células T e células NK, representado pela letra grega γ (Tisminetzky & Baralle, 2003; Abbas et al. 2007).

Os efeitos biológicos dos interferons do tipo I estão associados a infecções virais e imunidade mediada por células contra micróbios intracelulares. Seu uso combinado a outros fármacos possibilita uma ação terapêutica potencializada, como, por exemplo, com o uso de resinóides, que induzem a regressão de carcinoma escamoso da pele e cérvix, sugerindo-se que esta citocina possa influenciar na diferenciação celular. Inibe a proliferação vascular e endotelial permitindo seu uso em casos de hemangioma, melanomas e hipernefromas (Srivastava, 2005). Os INF tipo I incrementam a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I), pois os linfócitos T citotóxicos tipo CD8⁺ reconhecem os antígenos estranhos ligados às moléculas do MHC I, favorecendo o reconhecimento das células infectadas e levando à lise celular. Também incrementa a atividade citotóxica das células NK (Abbas et al. 2007).

A ação do IFN tipo I estimula o desenvolvimento de células TH1 em humanos. Este efeito deve-se, principalmente, à habilidade do INF tipo I em promover, nas células T, a expressão de receptores funcionais para o principal indutor de resposta do tipo TH1, a interleucina 12. Promove também o recrutamento de linfócitos nos linfonodos, com a ativação dos linfócitos por antígenos concentrados nesta região, em especial em infecções virais. Inibem a proliferação de muitos tipos celulares, incluindo linfócitos *in vitro*. É provável que isto ocorra graças à indução das mesmas enzimas que bloqueiam a replicação viral, porém podem envolver outras enzimas que também alteram o metabolismo dos aminoácidos, tais como triptofano (Abbas et al. 2007).

A principal atividade do interferon tipo I é a de erradicar a infecção viral. Experimentos com camundongos com ausência de receptores para INF tipo I estão

suscetíveis a infecções. O INF alfa é utilizado sobretudo como agente antiviral no tratamento de pacientes com hepatites virais (Abbas et al. 2007).

2.6.1 Mecanismo de ação

Os interferons atuam nas células ligando-se a receptores específicos da membrana celular. O processo de sinalização dos IFN tipo I, os quais incluem múltiplos subtipos de IFN alfa e um único beta, é iniciado pela ligação do monômero de IFN alfa ou beta ao receptor na membrana celular levando à ativação de enzimas Jak-1 e Tyk-2 e fatores Stat de transcrição Stat-1 e Stat-2 no citoplasma. Juntamente com o IRF-9, Stat-1 e Stat-2 formam o complexo proteico denominado ISGF3 (*Interferon Stimulated Response Element* – elemento de resposta ao Interferon ativado), que agora, no núcleo da célula, ativam os fatores de transcrição. A transcrição poderá ser ativada pela ligação ao Isre, elemento presente nos genes responsivos no IFN alfa/beta, incluindo IRF-1, o qual age diretamente, e o IF-9, o qual é o componente chave do IFN alfa/beta mediado pelo complexo ISGF3, conforme a figura 3.1. Vários outros genes, pelo menos 25, demonstram mudanças na expressão mais que quadruplicada em células tratadas com IFN alfa (Shtrichman & Samuel, 2001).

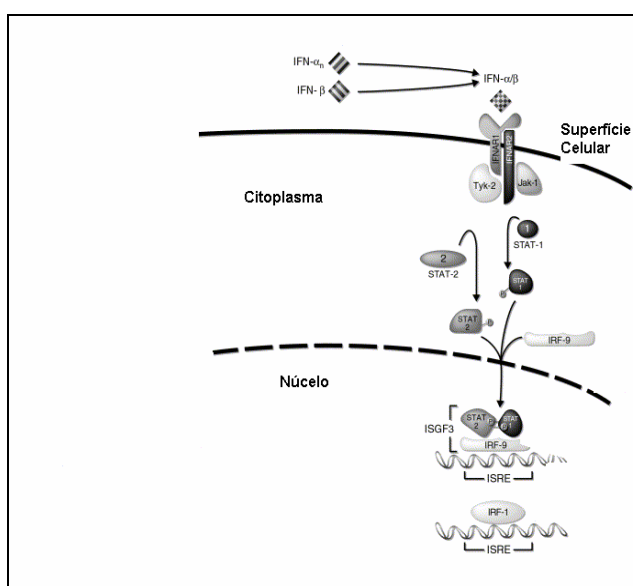


Figura 2.1 – Mecanismo de ação do Interferon alfa/beta na célula.

Fonte: Adaptado de Shtrichman & Samuel, 2001.

2.6.2 Uso terapêutico dos interferons

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

Os IFN tipo I são utilizados em tratamentos de câncer, como leucemias, carcinomas basais, câncer de mama, sarcoma de Kaposi em pacientes com Aids, carcinoma renal, linfoma folicular não Hodgkin, leucemia mielogênica crônica, hepatites e verrugas genitais (Srivastava et al. 2005).

O vírus da hepatite C (HCV) pertence ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. A transmissão se dá por via parenteral, por meio de transfusões sanguíneas, compartilhamento de agulhas entre consumidores de drogas injetáveis, hemodiálises, e, eventualmente, por contato sexual, quando microlesões estão presentes no trato genital (Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

Dados epidemiológicos recentes revelam que a prevalência global da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é de 2,2%, que corresponde a cerca de 130 milhões de pessoas. Estima-se também que esta infecção seja responsável por 27% das cirroses hepáticas e 25% dos HCC primários em todo mundo (Alter, 2007). Entretanto, as manifestações da infecção pelo HCV não acometem exclusivamente o fígado; são descritas outras doenças relacionadas a este vírus. Em um estudo de coorte realizado na Itália, quando 214 pacientes portadores do HCV foram acompanhados pelo período de 17 anos. Em 32% dos observados houve desenvolvimento de HCC. Em 23% ascite; icterícia em 17%; sangramento do trato gastrointestinal superior em 6%; e encefalopatia em 1% dos pacientes observados (Trinchet et al. 2007).

Pacientes infectados pelo HCV têm risco potencial de desenvolver cirrose hepática ou HCC, principalmente nos países industrializados, devido ao uso de drogas injetáveis. Na grande maioria dos casos, o diagnóstico da infecção viral é realizado quando o paciente já apresenta cirrose hepática. Coortes de pacientes portadores de HCV, o risco de desenvolver HCC em relação ao tempo é linear e alto (2% a 8%). Maior taxa é relatada no Japão (4% a 8%), nos países do Ocidente (2% a 4%). O risco de cirrose hepática relacionada ao HCV é ainda maior se comparado à ingestão de bebidas alcoólicas ou infecção por HBV (Alter, 2007).

A hepatite B também é causa importante de complicações hepáticas, podendo ocasionar HCC. O vírus da hepatite B (HCB), latente no organismo, pode ser reativado após tratamentos com quimioterápicos em portadores de câncer. Na hepatite B, ao contrário da hepatite C, há vacinação eficaz disponível, bem como marcadores apropriados para detecção do vírus. Por suas ações no organismo, a utilização dos IFN como estratégia para tratamento de doenças, como infecção pelo HCV, hepatite C crônica, pode impedir que ocorram no organismo lesões mais graves. Recomenda-se o uso da ribavirina associada ao IFN- α para pacientes infectados pelo HCV, com lesão hepática HCC ou cirrose. O tratamento depende do tamanho e extensão do tumor, função hepática e condições gerais do paciente. Os pacientes com HCC relacionado ao HCV, em geral, apresentam idade superior àqueles com cirrose alcoólica, ou relacionado ao HBV. Tumores em pacientes HCV positivos parecem ter crescimento mais lento. A prevalência do HCC na França aumentou de 3,2, em 1979, para 11,1, em 1994, por 100.000 habitantes. Há indicação que este aumento seja devido à infecção pelo HCV (Trinchet et al. 2007).

A incidência de casos de hepatite C tem aumentado ao longo dos anos. Pode se dar em função da introdução do diagnóstico da doença, ou atribuída ao aumento de usuários de drogas injetáveis, utilização de hemoderivados sem prévia avaliação criteriosa, além da alta atividade sexual. A caracterização epidemiológica da infecção pelo HCV é crucial para o estabelecimento de medidas preventivas efetivas (Alter, 2007).

2.6.3 Obtenção do produto Interferon alfa 2b hu-r

O IFN é produzido naturalmente pelo organismo por meio de mecanismos de imunomodulação e reação contra infecções virais, entretanto, este mecanismo é passageiro e muitas vezes a infecção instala-se no organismo. Assim, a administração de doses terapêuticas do biofármaco promove a recuperação do indivíduo (Walsh, 2003).

A obtenção do IFN alfa 2b hu-r a partir do isolamento de plasma humano tem baixos rendimentos e, por se tratar de um hemoderivado, há muitas exigências regulatórias para comercialização do produto. Vários estudos contribuíram para a obtenção em larga escala do produto. Alguns trabalhos descrevem a obtenção de

IFN em cultivo de células fibroblásticas em monocamada. Outros trabalhos demonstram a produção em células linfoblastóides, linhagem de células Namalva, as quais apresentam capacidade em se dividir e continuar a produção de IFN. O preparo de IFN a partir de leucócitos porcinos foi demonstrado em 1981, sendo avaliada sua atividade biológica em humanos (Osther, 1981).

A expressão de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante tem sido relatada desde a década de 1970. O cultivo da bactéria *E. coli* geneticamente modificada é a principal plataforma para expressão de proteínas heterólogas.

A tecnologia do DNA recombinante consiste na inserção de um gene, que codifica determinada proteína de interesse, em uma célula hospedeira. Este sistema, denominado 'eucariótico', permite que sejam utilizadas células de mamíferos, fungos ou levedura, como, por exemplo, *Pichia pastoris* (Hao *et al.*, 2007). Os sistemas procarióticos são constituídos pela inclusão de um plasmídeo modificado geneticamente através da inserção de um gene de interesse em uma bactéria. Este tipo de tecnologia permite que proteínas de interesse sejam produzidas em larga escala, com aumento do rendimento final, como é o caso do produto em estudo IFN alfa 2b hur.

A escolha do sistema de expressão para uma produção em larga escala de proteínas recombinantes depende de muitos fatores. Incluem-se as características de crescimento celular, níveis de expressão, expressão intra ou extracelular, modificações pós-traducionais e a atividade biológica da proteína de interesse, bem como exigências regulatórias na produção de proteínas terapêuticas (Makrides, 1996). Os sistemas de cultivo utilizados correntemente podem ser procarióticos ou eucarióticos. Utiliza-se comumente o microrganismo *E. coli* como vetor de expressão na produção em sistema procariótico. Já os sistemas eucarióticos podem utilizar linhagens celulares de mamíferos, fungos e leveduras.

O uso da bactéria *E. coli* para produção de proteínas heterólogas foi significativamente incrementado e podem ser classificados em três grupos: batelada, batelada alimentada e processo contínuo (Markrides, 1996). Devido ao baixo custo de produção, a bactéria *E. coli* é a mais utilizada como sistema de produção, uma vez que a atividade biológica das proteínas de interesse é mantida com este tipo de produção (Eitman & Altman, 2006).

Os cultivos em fungos e leveduras recombinantes, como por exemplo, a levedura *Pichia pastoris*, a secreção da proteína de interesse IFN alfa 2b hur ocorre no meio de cultivo, facilitando a etapa de purificação subsequente. No entanto, além da secreção da proteína de interesse para o meio, ocorre também secreção de enzimas proteolíticas, que podem levar à degradação do IFN, o que acarreta rendimentos menores. Em um sistema bacteriano, entretanto, a proteína acumulada em sua forma insolúvel no citoplasma celular está protegida do ataque proteolítico, porém a sua recuperação exige etapas adicionais de purificação (Hao et al. 2007).

Na década de 1980, muita informação acerca da genética e da fisiologia bacteriana foi acumulada e o microrganismo *E. coli* tornou-se o organismo de escolha para a produção de proteínas recombinantes (Shiloach & Fas, 2005). Portanto, o sistema procarioto é o escolhido para a obtenção de IFN alfa 2b hur. A tecnologia do DNA recombinante propiciou aumento de rendimento, uma vez que é produzido um único subtipo da citocina, além da utilização de sistemas procarióticos cujas exigências para crescimento são menores se comparado a um sistema eucariótico, anteriormente preconizado (Walsh, 2003).

Esta tecnologia inclui duas etapas principais e distintas para obtenção da proteína heteróloga, por meio da fermentação ou biorreação e a etapa de purificação. O cultivo em biorreatores possibilita a produção em larga escala da proteína terapêutica em estudo. O processo de purificação garantirá a eficácia e segurança do produto. Para que este grau de qualidade seja obtido, são tomadas medidas preconizadas nas normas de Boas Práticas de Fabricação (RDC n. 210, 2003) nos processos produtivos, bem como ensaios de controle da qualidade realizados nos produtos em processo em cada etapa de obtenção do produto.

2.6.4 Obtenção do microrganismo recombinante

Apesar da tecnologia do DNA recombinante ser relativamente simples de se entender, a obtenção de um produto utilizando esta tecnologia é altamente sofisticada e requer conhecimento detalhado em muitas áreas, incluindo-se química, imunologia, farmácia, biologia molecular, engenharia química (Garnick et al. 1988).

O início de todo o processo para obtenção da proteína recombinante está nas etapas de construção do plasmídeo, transformação no vetor de expressão e seleção

do clone recombinante que expresse o produto desejável. A construção do vetor recombinante prevê a introdução do gene de interesse, no caso IFN alfa 2b hur no vetor de expressão, *E. coli*, por meio de metodologias da biologia molecular como uso de enzimas de restrição e DNA ligase. Outros elementos genéticos são também inseridos, como códon de iniciação, região promotora, sítio de ligação ribossomal, iniciadores e terminadores de transcrição e tradução estão presentes no vetor de expressão.

O vetor recombinante é transformado em uma cepa não patogênica de *E. coli*. As etapas seguintes englobam a identificação do produto do gene e controle do lote de banco de células, assegurando que as células recombinantes sejam reprodutíveis, estáveis e viáveis (Srivastava et al. 2005). A figura 2.2 ilustra, de maneira esquemática, a obtenção de uma molécula recombinante.

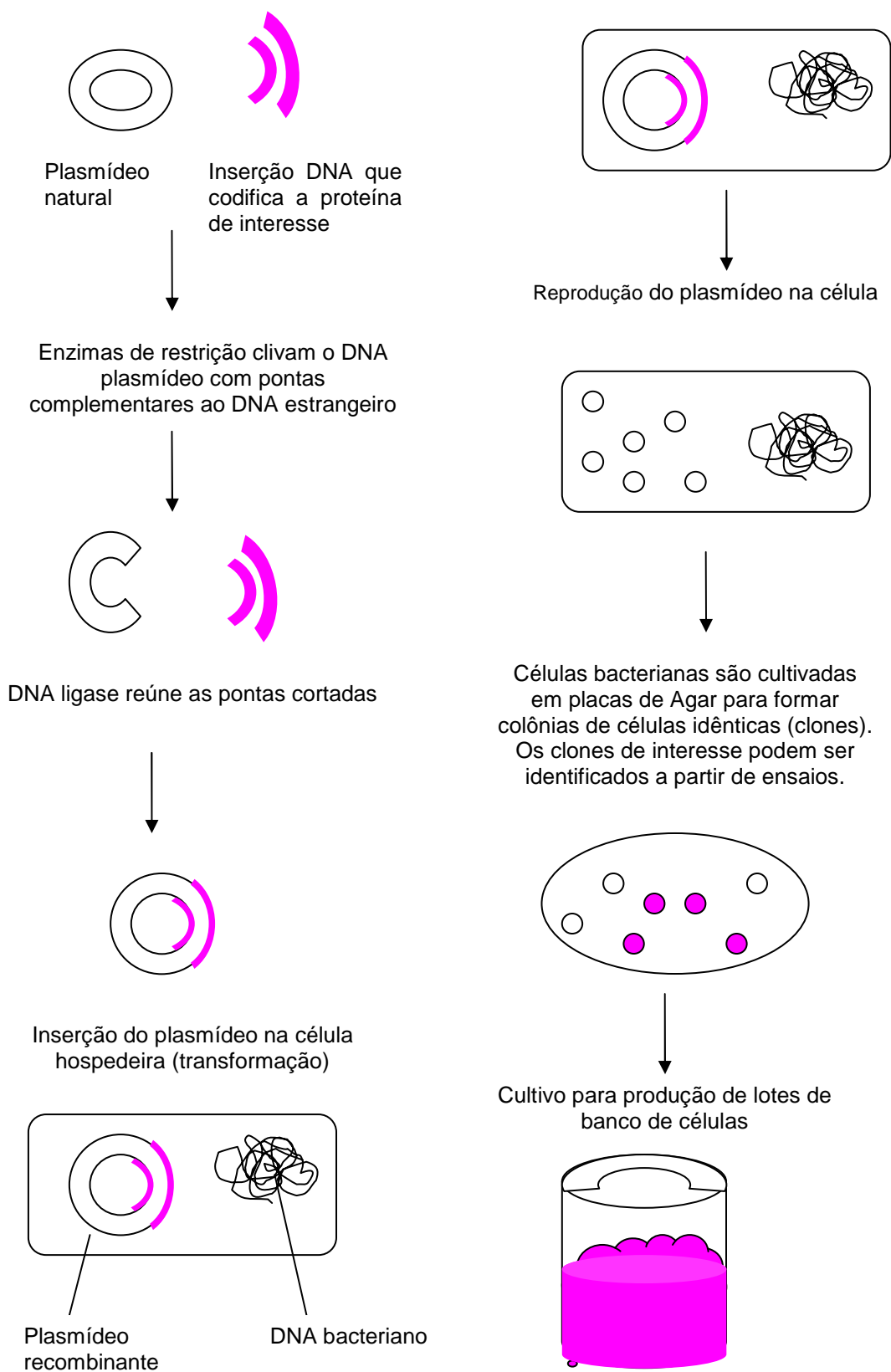


Figura 2.2 – Esquema simplificado da construção de uma molécula recombinante.

Fonte: Garnick et al. 1988.

2.7 Etapas do processo de produção

Em um processo biotecnológico convencional utiliza-se o microrganismo patogênico, responsável pela causa da enfermidade, devidamente isolado e caracterizado. Os pontos críticos das diversas etapas da produção são avaliados e controlados ao longo do processo, como a análise da pureza do cultivo e a taxa de crescimento específico (Garnick et al. 1998).

No caso de processos biotecnológicos com a utilização de microrganismos recombinantes, as etapas do processo produtivo precisam ser mapeadas para elencar os diferentes pontos críticos para garantir da consistência de produção a tempo e a hora.

A figura 2.3 ilustra o fluxograma de processo para obtenção do IFN alfa 2b *in vitro*. As etapas do processo produtivo foram propostas a partir de dados de literatura. As premissas estabelecidas foram a utilização de um sistema procariótico, *E. coli*, a partir de um banco de células de trabalho já estabelecido.

A etapa de obtenção do produto ou *upstream* envolve a biorreação ou fermentação, quando ocorre a expressão da proteína e sua recuperação, através de várias etapas desde a ruptura celular, centrifugação do material, lavagens sucessivas para remoção dos debrís celulares, e a solubilização do material de interesse.

A etapa de purificação denomina-se *downstream*, quando se aplicam técnicas cromatográficas com intuito de obter-se um alto grau de pureza no ingrediente farmacêutico ativo, IFA.

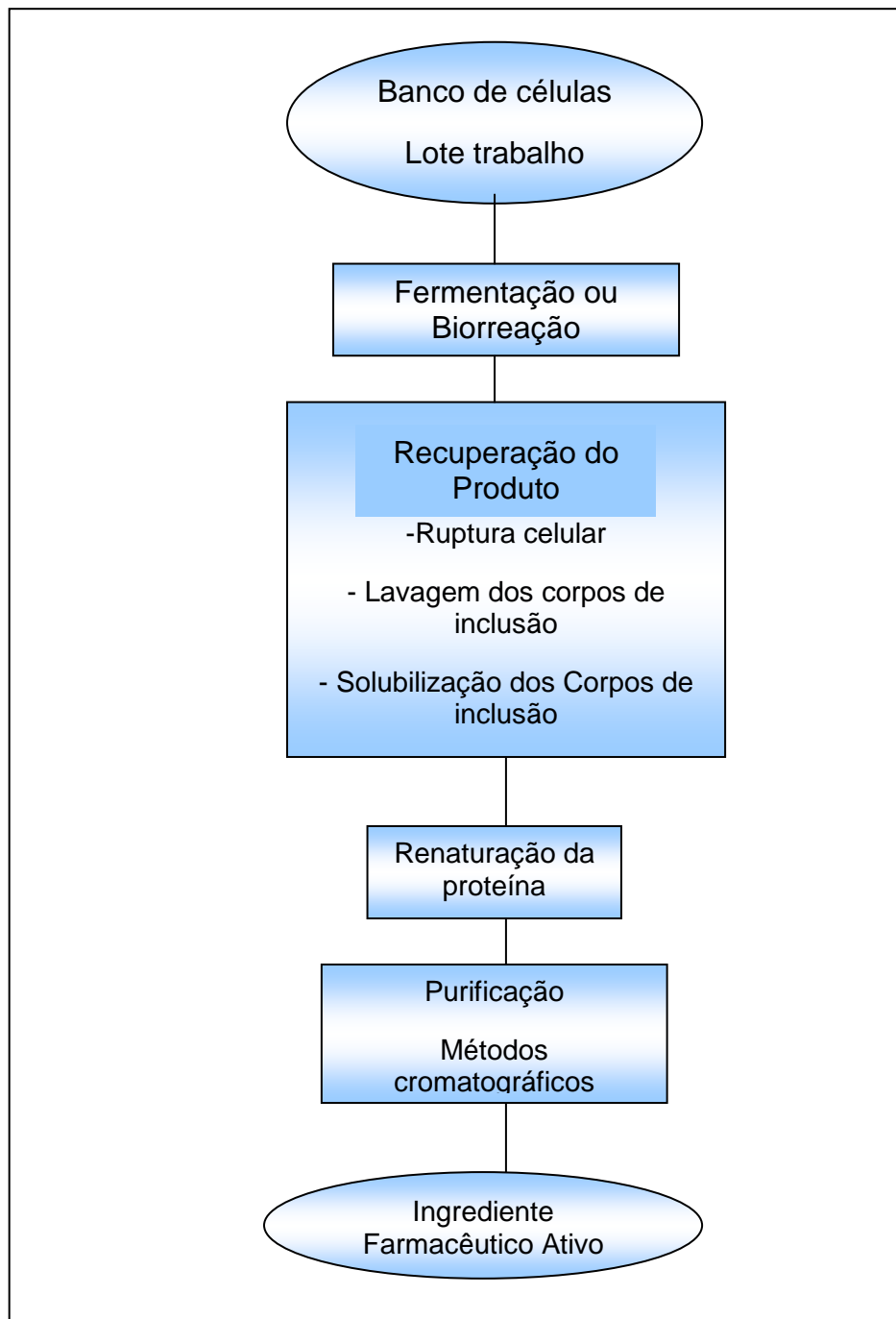


Figura 2.3 – Fluxograma esquemático do processo para obtenção do IFN alfa 2b hu-r.

Fonte: Adaptado de Jungbauer et al. 2004 & Olson, 1985.

2.7.1 Banco de Células: Lote Trabalho

O banco de células prevê a guarda de um lote de células que serão utilizadas na biorreação ou fermentação. Não serão tratadas neste estudo, pois se trata de uma atribuição do controle da qualidade e não do controle em processo.

2.7.2 Fermentação ou Biorreação

A biorreação ou fermentação é a parte do processo em que há manipulação das células vivas para obtenção do produto. O objetivo é recuperar grandes quantidades do material, ou seja, altos rendimentos com monitoramento de cada etapa do processo produtivo.

Como fonte de energia ou fonte de carbono é descrito o uso de glicerol, metanol e glicose. A oferta de nitrogênio é proveniente do extrato de levedura e são adicionados também sais minerais e, em alguns casos, antibióticos (Srivastava et al. 2005). Os antibióticos são usados no meio de cultivo com a intenção de selecionar as células recombinantes, pois marcadores específicos de seleção (ampicilina ou canamicina) podem estar presentes em algumas construções recombinantes. Várias composições de meio de cultivo podem ser utilizadas para o cultivo do microrganismo *E. coli* recombinante – estudos demonstram o uso dos meios LB, *Luria Bertani broth*, *Terrific broth* e M9, *Minimal media* (Srivastava et al. 2005).

Quando a fonte de energia é a glicose, um dos metabólitos formados e excretados ao meio é o acetato, que em geral acontece sob condições aeróbicas em resposta ao excesso de fonte de carbono em especial, a glicose. Em altas concentrações, os sais de acetato inibem o crescimento celular e a produção da proteína heteróloga. Estudos sobre a produção em batelada alimentada utilizam como fonte de carbono a glicose adicionada ao meio lentamente, o que minimiza a produção do íon acetato. A diálise durante a fermentação também pode ser adotada como estratégia a fim de minimizar a concentração tóxica da formação do íon (Schiloach & Fass, 2005). O acúmulo de acetato no meio é uma função direta da composição do meio de cultivo e da cepa utilizada que estão diretamente

relacionadas com a taxa de crescimento específico e a fonte de carbono (Khalilzadeh et al. 2004).

Várias foram às estratégias desenvolvidas a fim de se evitar a formação de excesso do íon acetato no meio. Parte delas está ligada a modificações genéticas, como utilizar cepas do microrganismo com menor propensão à formação do acetato, ou interromper o sistema fosfotransferase para utilização da glicose, ou ainda interromper a regulação do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). E outras estratégias estão diretamente relacionadas a condução do processo, podendo se adicionar nutrientes em resposta a variação do pH, introduzir pulsos de glicose e observar a resposta do parâmetro oxigênio dissolvido, utilizar outra fonte de carbono que não a glicose, por exemplo glicerol, lactose, em alguns casos selecionar os principais aminoácidos da proteína recombinante para compor o meio de indução pode diminuir os efeitos negativos do íon acetato (Eiteman & Altman, 2006).

Os controles da fermentação como velocidade de agitação, oxigênio dissolvido, pH do meio e formação de metabólitos indesejáveis precisam ser monitorados e controlados pela equipe da produção, responsável pela biorreação. Os parâmetros aceitáveis são estabelecidos durante o desenvolvimento laboratorial. Em menor escala é possível avaliar os impactos das variáveis no rendimento dos produtos e outros parâmetros são levados em consideração na ampliação de escala, como desenho e geometria dos equipamentos (Schimidt, 2005).

A expressão das proteínas pelo microrganismo em alguns processos se dá a partir da etapa de indução, que pode ser desencadeada pela alteração de temperatura ou restrição de substrato, ou ainda pela incorporação ao meio de agentes indutores da expressão da proteína (Markrides, 1996).

Após o tempo decorrido de processo de fermentação e indução para alguns processos, o cultivo deverá ser centrifugado e o sobrenadante inativado por adição de agente químico ou por calor. O material sólido contendo a proteína heteróloga é mantido sob refrigeração para as etapas posteriores (Olson, 1985).

2.7.3 Recuperação do produto

Esta etapa compreende as etapas:

- Ruptura celular e isolamento dos corpos de inclusão;

- Centrifugação: separação dos debris celulares do sobrenadante;
- Lavagem dos corpos de inclusão;
- Solubilização dos corpos de inclusão: Adição de agentes desnaturantes.

A partir da expressão da proteína recombinante em cultivos de *E. coli*, a qual ocorre com a expressão da proteína no citoplasma bacteriano, produto da biorreação. Quando há expressão de proteínas eucarióticas em sistemas procarióticos ocorre a formação de grandes quantidades desta proteína, e esta acumula-se no citoplasma em sua forma insolúvel, denominando-se 'corpos de inclusão'. Na grande maioria das vezes os corpos de inclusão podem ser visualizados em microscópio como pontos brilhantes dentro das células (Olson, 1985).

Quando outros sistemas de expressão são utilizados e as proteínas de interesse são secretadas para o meio extracelular, elas podem ser degradadas por enzimas proteolíticas do sistema hospedeiro, o que representa uma grande desvantagem deste tipo de sistema de produção quando comparado com proteínas expressas em corpos de inclusão. Desse modo, é bom mencionar que as proteínas em corpos de inclusão precisam ser desnaturadas e renaturadas e em alguns casos a atividade biológica do produto pode ficar comprometida. Quando as proteínas recombinantes são produzidas com expressão citoplasmática, altos rendimentos do produto podem ser obtidos, por vezes até 50% das proteínas totais são produzidas (Hao, 2007).

Na grande maioria das vezes, no sistema procariótico, a proteína de interesse está insolúvel no citoplasma, e isto ocorre porque é muito frequente se ter proteínas de origem eucariótica sendo expressa em um sistema procariótico. Além disso, existem fatores que favorecem a formação dos corpos de inclusão, como por exemplo, temperatura de cultivo região promotora de promotores altamente expressos e altas concentrações de produto (Sundström, 2007). A figura 2.4 ilustra a formação de corpos de inclusão em cultivo de *E. coli*.

Conforme exposto, é necessário recuperar os corpos de inclusão e recobrar a atividade biológica da proteína IFN alfa 2b hur. Assim, há a separação entre o produto de interesse do restante do material proveniente da biorreação.

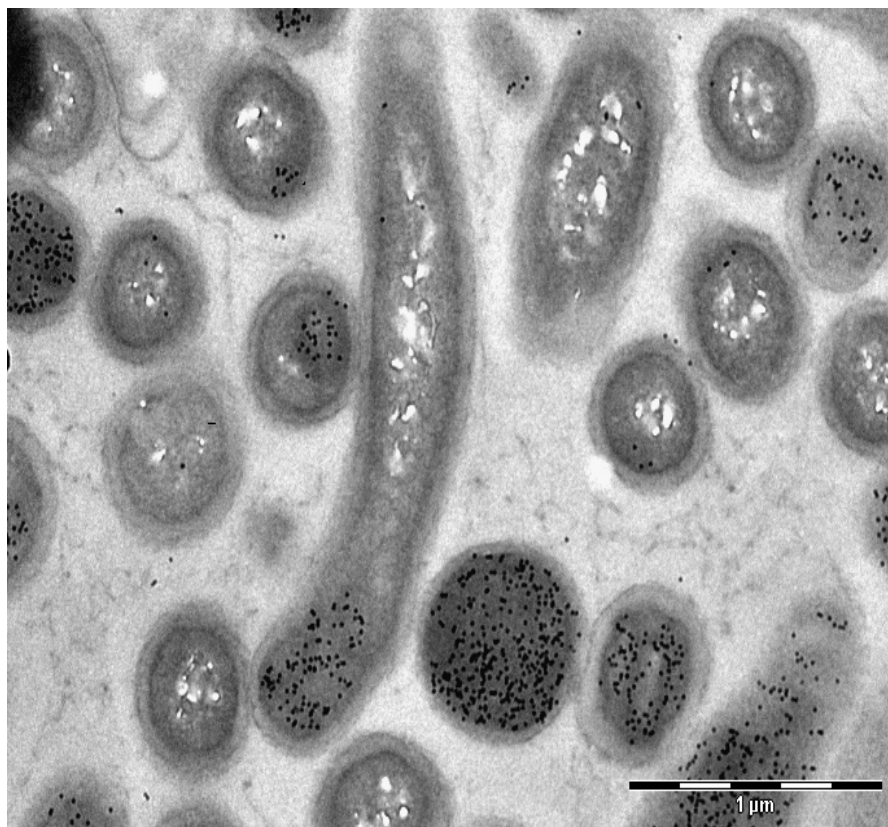


Figura 2.4 – Microscopia eletrônica de um cultivo de *E.coli* com a formação de corpos de inclusão.
Fonte: [HTTP://www.ccmrcornell.edu/facilities/contestimages/winners08.Jam/Chem.html](http://www.ccmrcornell.edu/facilities/contestimages/winners08.Jam/Chem.html).

No caso em estudo, a proteína de interesse é expressa no citoplasma celular e agrega-se sob a forma insolúvel como corpos de inclusão. Para removê-la da célula, são necessárias lise celular e separação da proteína insolúvel da biomassa. A lise celular pode ser obtida por métodos físicos ou químicos. Olson (1985) descreve o uso da prensa francesa, oscilador sônico ou prensa Manton-Gaulin, como métodos físicos utilizáveis. A ação de lisozimas é um método químico também utilizável nesta etapa, para facilitar o processo de rompimento (Olson, 1985). A proteína é solubilizada pela adição ao meio de agente desnaturante. Tais agentes podem ser classificados como fracos ou fortes. Sais de guanidina, soluções de ureia em altas concentrações entre 4 a 9 M, considerados agentes desnaturantes fortes e detergentes como Dodecil sulfato de sódio (SDS), e triton em concentrações entre 0,01 a 2% são avaliados como agentes desnaturantes. O uso dos agentes fortes em baixas concentrações pode levar à solubilização de proteínas não específicas, aquelas oriundas das células hospedeiras (Olson, 1985).

O uso de tampões Tris/ureia em pH entre 7,5-8,0 também foram estudados e são capazes de solubilizar os corpos de inclusão no produto da biorreação. A

biomassa ressuspensa no tampão é mantida sob agitação e baixa temperatura, a fim de preservar a proteína (Mohammadian-Mosaabadi et al. 2007).

Uma vez os corpos de inclusão solubilizados, segue-se uma etapa de centrifugação, a fim de remover os debris celulares insolúveis no meio. O *pellet* agora será o descarte e o sobrenadante contendo o IFN desnaturado sofrerá ação de um agente para re-enovelamento, a fim de assumir sua estrutura terciária e, por conseguinte, recuperar a atividade biológica. Este tampão tem em sua composição substâncias como ureia, Tris/ácido clorídrico, com pH em torno de 8,0. A ureia e sais adicionais são removidos do meio através de diálise contra tampão sem ureia em sua composição (Srivastava, 2005).

2.7.4 Purificação

Em decorrência da ruptura celular, além da proteína recombinante há também material proveniente da célula hospedeira. Como se trata de microrganismo Gram negativo, a presença de endotoxinas, lipopolissacarídeos estão presentes junto ao produto de interesse, além dos resíduos celulares, partículas de DNA e outras proteínas não específicas. A etapa subsequente à renaturação da proteína é a de purificação, para remoção de todo e qualquer contaminante proveniente da célula hospedeira e outras proteínas celulares. Outras impurezas estão relacionadas com o produto, como, por exemplo, a formação de dímeros, proteólise, aminação e desaminação. O desenho do processo de purificação deve ser eficiente a ponto de eliminar as impurezas indesejáveis com vistas a garantir a segurança do produto e ao mesmo tempo conferir altos rendimentos do processo de produção (Mohammadian-Mosaabadi et al. 2006).

Os métodos cromatográficos têm sido bastante explorados para purificação do IFN alfa 2b hur. Técnicas distintas, como exclusão molecular por tamanho, troca iônica, afinidade, fase reversa, são encontrados na literatura. Uma das estratégias de purificação alia duas técnicas cromatográficas: troca iônica e exclusão molecular (Olson, 1985).

O processo de purificação pode agregar várias técnicas cromatográficas e é capaz de obter um produto com maior grau de pureza, compatíveis com as normas regulatórias para comercialização de produtos de uso parenteral.

A cromatografia de afinidade por metais, ou Imac, é uma estratégia amplamente utilizada que permite separar a proteína de interesse por meio de um marcador – cauda de histidina, glutathione S-transferase, manitol – das demais proteínas do meio. Estes marcadores também chamados ‘parceiros de fusão’ já estão disponíveis comercialmente nos vetores de expressão para clonagem dos genes que codificam a proteína de interesse. No caso da histidina, em particular, como não há especificidade, há probabilidade de interação de cargas entre o metal e algumas proteínas não específicas, e, portanto são necessários outros passos de purificação para obtenção do produto (Ettlin et al. 1999). As colunas cromatográficas para a técnica de Imac para o marcador histidina podem ser sensibilizadas com metais como cobalto, níquel, zinco e cobre, por exemplo. A eluição da proteína se dá pela composição da fase móvel, composta por agentes redutores, os quais reduzem os metais e facilmente deslocam as proteínas de interesse da matriz cromatográfica (Ettlin et al.1999).

A técnica de imunoafinidade consiste na separação da proteína de interesse pela ligação específica entre o produto e um anticorpo específico ligado à matriz cromatográfica. Os anticorpos produzidos são murinos e podem ser carregados junto ao produto quando eluem, o que pode acarretar contaminação da proteína de interesse por vírus ou materiais provenientes dos anticorpos monoclonais. Outro tópico importante é a questão de se manter uma produção paralela de anticorpos monoclonais a fim de sensibilizar as matrizes cromatográficas.

Foi descrita uma purificação do IFN alfa 2b hur em um único passo com o uso da técnica de troca iônica. Esta técnica cromatográfica se baseia na carga líquida da proteína, que se liga à matriz cromatográfica com carga oposta. Para o deslocamento da proteína, utiliza-se a estratégia de aumentar gradativamente a força iônica do eluente até a completa remoção do produto. Este processo deve ser monitorado ao longo do tempo de eluição e a cada fração recolhida (Babu, 2005). Um método rápido e bastante aplicado é medir a densidade óptica a 280 nm (Olson, 1985). Acompanha-se também a eliminação de ácidos nucleicos, através da leitura direta em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm.

A estratégia proposta para purificação da proteína pode ter mais de um passo, porém, o controle e monitoramento de cada etapa devem ser realizados com o intuito de garantir o grau de pureza necessário e ausência de substâncias que possam afetar a qualidade da proteína.

O conhecimento prévio do ponto isoelétrico da proteína permite estabelecer as condições da cromatografia, como fluxo de operação, tipo de resina a ser usada e dimensionamento da coluna cromatográfica. Em uma solução contendo o material desejado, com força iônica relativamente baixa, em pH superior ao pH do ponto isoelétrico da proteína, a carga elétrica da proteína assume valor parcial negativo. Assim, uma matriz carregada positivamente é capaz de reter o material. Aplicando-se gradiente linear com aumento da força iônica é possível deslocamento do material de interesse da matriz da coluna cromatográfica. A detecção da proteína se dá, em geral, por filtro ultravioleta (Scapol, 2005).

A partir deste material eluído, amostras são retiradas a fim de se evidenciar o grau de pureza, caracterização, teor, peso molecular e atividade biológica da proteína. O monitoramento de contaminantes como proteínas totais em relação à quantidade de proteínas específicas, teor de ácidos nucleicos, e teor de endotoxinas.

O ingrediente farmacêutico ativo, IFA purificado, é estocado até o processamento final. Estas atividades não fazem parte do escopo deste estudo.

2.8 Objetivos gerais

Pretende-se apresentar um modelo de laboratório de controle em processo, utilizando como exemplo o processo de produção do Interferon alfa 2b humano recombinante.

2.8.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do estudo são:

- Estabelecer os pontos críticos de controle para INF alfa 2b hur;
- Estabelecer os requisitos gerenciais e técnicos preconizados no procedimento GGLAS 02/17025;
- Estabelecer ferramentas da qualidade aplicadas ao Controle em Processo.

2.8.2 Relevância do estudo

O processo biotecnológico de obtenção de uma proteína recombinante para fins farmacêuticos deve seguir uma série de critérios estabelecidos em normas vigentes, dentre elas, as Boas Práticas de Fabricação. O controle em processo é de grande relevância durante a obtenção do produto, pois norteia os ajustes no processo produtivo através dos resultados analíticos obtidos, além de garantir a qualidade ao longo do processo de produção. Os resultados, portanto, devem possuir alto grau de confiança.

Neste estudo será abordado um modelo para gerenciamento de um laboratório analítico destinado à produção de proteínas recombinantes expressas em sistema procariótico, mais especificamente voltado para o produto IFN alfa 2b hu-r.

3 Metodologia

Para a estruturação de um laboratório de controle em processo é necessário conhecer o processo de produção, suas diferentes etapas e seus pontos de controle. Desta maneira, a atividade de controle em processo cumprirá seu papel com eficiência.

Neste contexto, o fluxo de trabalho do controle em processo é bastante dinâmico e segue a seguinte lógica:

- Mapear o processo de produção: definir os Pontos Críticos de Controle;
- Monitorar o processo de produção: Definição das metodologias analíticas;
- Estabelecer a frequência do monitoramento;
- Definir limites de aceitação;
- Estabelecer ações para ajustes no processo.

Portanto, usou-se esta mesma lógica para o produto INF alfa 2b hu-r, com base em um fluxograma do processo previamente estabelecido.

1. Mapear o processo de produção e definir os PCC, utilizando a metodologia HACCP (OMS, 2007).
2. Estabelecer sistemáticas para monitoramento dos PCC, através da definição de metodologias analíticas, frequência e limites de aceitação. As metodologias foram selecionadas em literatura, assim como se valeram da experiência prévia da unidade – quando foi estabelecido o laboratório de controle em processo destinado à produção da vacina contra Hib.
3. Estabelecer ações para ajustes no processo e confiabilidade dos resultados. Foi utilizado o procedimento 02/17025 da GGLAS para

4. Definir os requisitos técnicos e gerenciais. As diretrizes já estabelecidas no sistema da qualidade vigente em Bio-Manguinhos foram usadas também de modo a não haver conflitos com o sistema da qualidade estabelecido na unidade.

4 Resultados e Discussão

4.1 Pontos críticos de controle

Há um novo conceito das agências regulatórias, em que a consistência de produção de biológicos não pode estar somente baseada nos procedimentos operacionais padronizados. O conhecimento aprofundado do processo e controle é direcionado de forma a melhorar a qualidade dos processos e conseqüentemente dos produtos (Gnoth et al. 2007).

Por meio de análise criteriosa de cada estágio da produção até a obtenção do ingrediente farmacêutico ativo, são determinados pontos que podem ameaçar a qualidade do produto, ou seja, pontos que precisam ser monitorados para garantir a qualidade ao final de cada etapa.

Com base nas etapas do processo de produção, aplicou-se o modelo apresentado na figura 4.1, a fim de selecionar os pontos considerados críticos e que merecem monitoramento e averiguações. As diretrizes da ferramenta HACCP foram aplicadas às diferentes etapas apresentadas no trabalho. O método consiste em avaliar criticamente a retirada de amostra em cada etapa e registrar seu grau de criticidade com relação do processo. A partir de algumas diretrizes, pode-se construir a figura 3.5, a qual apresenta a seqüência de perguntas acerca de cada etapa proposta para a produção do IFN alfa 2b hur.

São realizados ensaios com o objetivo de verificar os parâmetros da qualidade dos produtos biológicos. O foco está em garantir a segurança e eficácia dos produtos obtidos.

Ao aplicarmos o diagrama ilustrado na figura 4.1 faz-se uma avaliação crítica dos pontos de controle. Ao se observar que a etapa do processo não pode ser modificada, torna-se crucial o monitoramento através da aplicação de uma técnica analítica. Se, por outro lado, for possível modificar a etapa de produção de modo a eliminar a verificação neste ponto, este deixa de ser crítico e sua avaliação não é

crucial para a tomada de decisão no processo. A partir desta avaliação, elaborou-se a matriz, apresentada na tabela 4.1, determinando os pontos críticos de controle para o processo de produção. Estes pontos críticos de controle relacionam ações preventivas de modo a se prevenir os eventos não-conformes durante a produção. A figura 4.2, apresentada na sequência, ilustra o fluxograma do processo de produção com seus pontos críticos de controle.

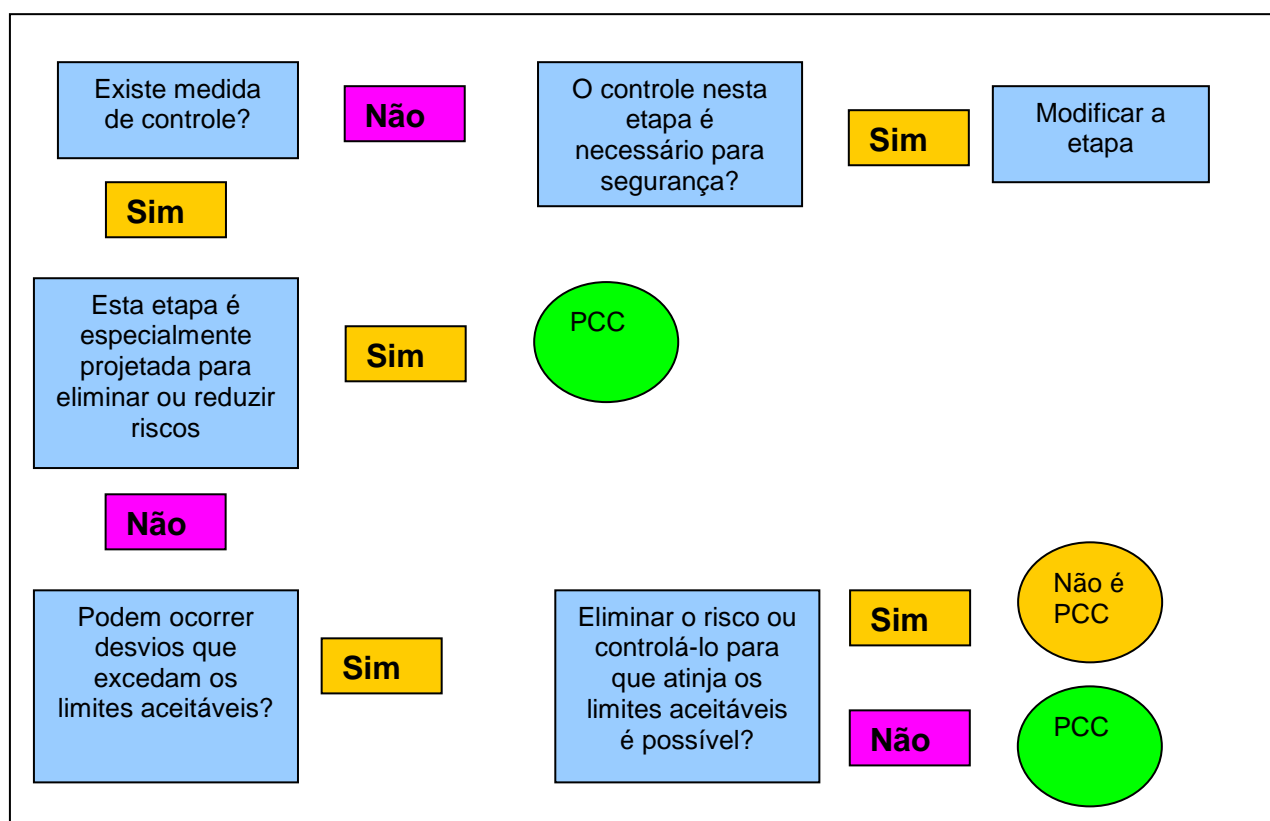


Figura 4.1– Sequência de perguntas acerca de cada etapa proposta para a produção do IFN alfa 2b hr. Fonte: Carelli, AC, 2008.

Tabela 4.1 – Pontos críticos de controle e ações sugeridas para o processo produtivo de IFN alfa 2b hur

Estágio (PCC)	Ameaça	†Limite crítico	Monitoramento		Ações sugeridas
			Método	Frequência	
*Banco de células: Lote trabalho	Baixa estabilidade plasmidial (EP).	EP=Viabilidade s/ antibiótico/ viabilidade c/ antibiótico.	Avaliação da estabilidade plasmidial	No início da produção a cada lote, até estabelecer a consistência de produção. Após estabelecer a consistência, semestralmente	Preparar novo lote trabalho
Biorreação	*Parâmetros de fermentação fora do especificado: Agitação, temperatura, aeração, pressão, pH, oxigênio dissolvido, fonte de carbono, metabólitos (acetato), formação de espuma. Densidade óptica.	Agitação: Temperatura: Aeração pO ₂ : Formação de espuma: DO 600 nm: pH:	Calibração prévia dos biossensores	A cada lote de fermentação	Troca dos sensores. Possuir sensores disponíveis na área para eventuais substituições. Calibrações dos sensores e verificações periódicas com uso de padrões e procedimentos preestabelecidos.
	*Numero de bactérias viáveis abaixo do recomendado. Viabilidade de cultivo.	Número de Unidades formadoras de Colônia/mL (UFC/mL).	Semeadura em placas contendo Agar apropriado.	A cada lote	Avaliação dos parâmetros de fermentação, calibração de sensores e promoção de crescimento dos meios de cultivo
	*Falta de pureza no pré-cultivo e cultivo em biorreator.	Pureza: Cultivo puro: bacilos Gram negativos Ensaio qualitativo.	Observação em esfregaço em lâminas coradas pelo método de Gram Semeadura em placas contendo Agar nutriente	A cada lote, a cada retirada de amostra	Em caso de contaminação investigação acerca da esterilização dos materiais e meio de cultivo. Verificação dos meios de cultivo utilizados.
	Não formação de produto.	A partir da indução, formação de corpos de inclusão.	Após preparo da amostra: eletroforese (SDS PAGE), teor de proteínas método colorimétrico segundo Lowry, Western Blot.	A cada lote, ou a cada retirada da amostra para cinética	Avaliação das matérias-primas constituintes dos meios de cultivo, parâmetros de processo de fermentação e estabilidade plasmidial e viabilidade do cultivo.

Tabela 4.1.– Pontos críticos de controle e ações sugeridas para o processo produtivo de IFN alfa 2b hur (*continuação*)

Estágio (PCC)	Ameaça	†Limite crítico	Monitoramento		Ações sugeridas
			Método	Frequencia	
Ruptura celular	Baixa eficiência da ruptura celular e falta de controle da temperatura durante o processo.	Temperatura: 2 a 8°C Tempo requerido para ruptura.	Monitoramento da temperatura ao longo do processo.	A avaliação da eficiência da ruptura celular deve ser realizada através de estudo e da consistência dos lotes de produção.	Validação do processo de ruptura celular. Calibração dos sensores de temperatura: qualificação do equipamento.
Centrifugação	Baixa eficiência da centrífuga. Manutenção da temperatura para conservação da proteína formada.	Temperatura: 2 a 8°C Tempo requerido para centrifugação Fluxo de alimentação	Monitoramento da temperatura ao longo do processo, bem como a velocidade de centrifugação.	A eficiência da centrifugação deverá ser estabelecida a partir de estudos da consistência dos lotes de produção.	Validação do processo de centrifugação. Calibração dos sensores de temperatura: qualificação do equipamento
	Baixa recuperação de biomassa.	Deve ser estabelecido a partir do processo implantado	Monitoramento da biomassa por pesagem	A cada lote.	Verificação dos perfis de produção e resultados dos ensaios de controle em processo. Avaliação criteriosa dos meios de cultivo tanto para reação quanto para ensaios. Verificação da balança
Lavagem dos corpos de inclusão	Tampões de lavagem fora das especificações podem comprometer a purificação. Verificação do pH, condutividade, endotoxinas ns tampões de lavagem.	pH: Condutividade: Endotoxinas:	Potenciométrico <i>LAL in vitro</i> ” Gel clot	A cada preparo de lote de tampões.	Calibração prévia dos sensores de pH e condutividade. Manutenção preventiva nos equipamentos potenciômetro e condutivímetro.

Tabela 4.1 – Pontos críticos de controle e ações sugeridas para o processo produtivo de IFN alfa 2b hur (continuação)

Estágio (PCC)	Ameaça	†Limite crítico	Monitoramento		Ações sugeridas
			Método	Frequencia	
Solubilização os corpos de inclusão	Condutividade e pH das soluções desnaturantes.	pH: Condutividade: Endotoxinas	Potenciométrico <i>LAL in vitro Gel clot</i>	A cada preparo de lote de tampões.	Calibração prévia dos sensores de pH e condutividade.
	Teor de proteínas totais Grau de pureza e Peso molecular.	Proteínas totais: Grau de pureza:	Colorimétrico, segundo Lowry: SDS-PAGE/HPLCRP/Eletroforese capilar	A cada lote processado.	Avaliação dos métodos analíticos (validação), equipamentos (calibração ou qualificação) e operadores (treinamento e validação).
Purificação Técnicas cromatográficas	Condutividade, pH e teor de endotoxinas dos eluentes.	pH: Condutividade: Endotoxinas.	Potenciométrico <i>LAL in vitro” Gel clot</i>	A cada preparo de lote de tampões.	Calibração prévia dos sensores de pH e condutividade. Manutenção preventiva nos equipamentos potenciômetro e condutivímetro.
	Teor de proteínas totais Grau de pureza e peso molecular. Identidade.	Proteínas totais: Eletroforese: Identidade:	Método colorimétrico segundo Lowry Eletroforese (SDS-PAGE), **eletroforese capilar ou ***HPLC –RP.	A cada lote processado.	Avaliação dos métodos analíticos (validação), equipamentos (calibração ou qualificação) e operadores (treinamento e validação).

† Os limites críticos devem ser estabelecidos durante a avaliação da consistência de produção e a partir dos dados de transferência de tecnologia.

Fonte: Elaborado com base em: *Trotta, P. P. *et al.*, 2000. **Altria K. D., Kelly, M. A., Clarck, B. J., 1998.;***Zarrin, A., Foroozesh, M., Hamidi, M., Mohammadi-Samani, S., 2006

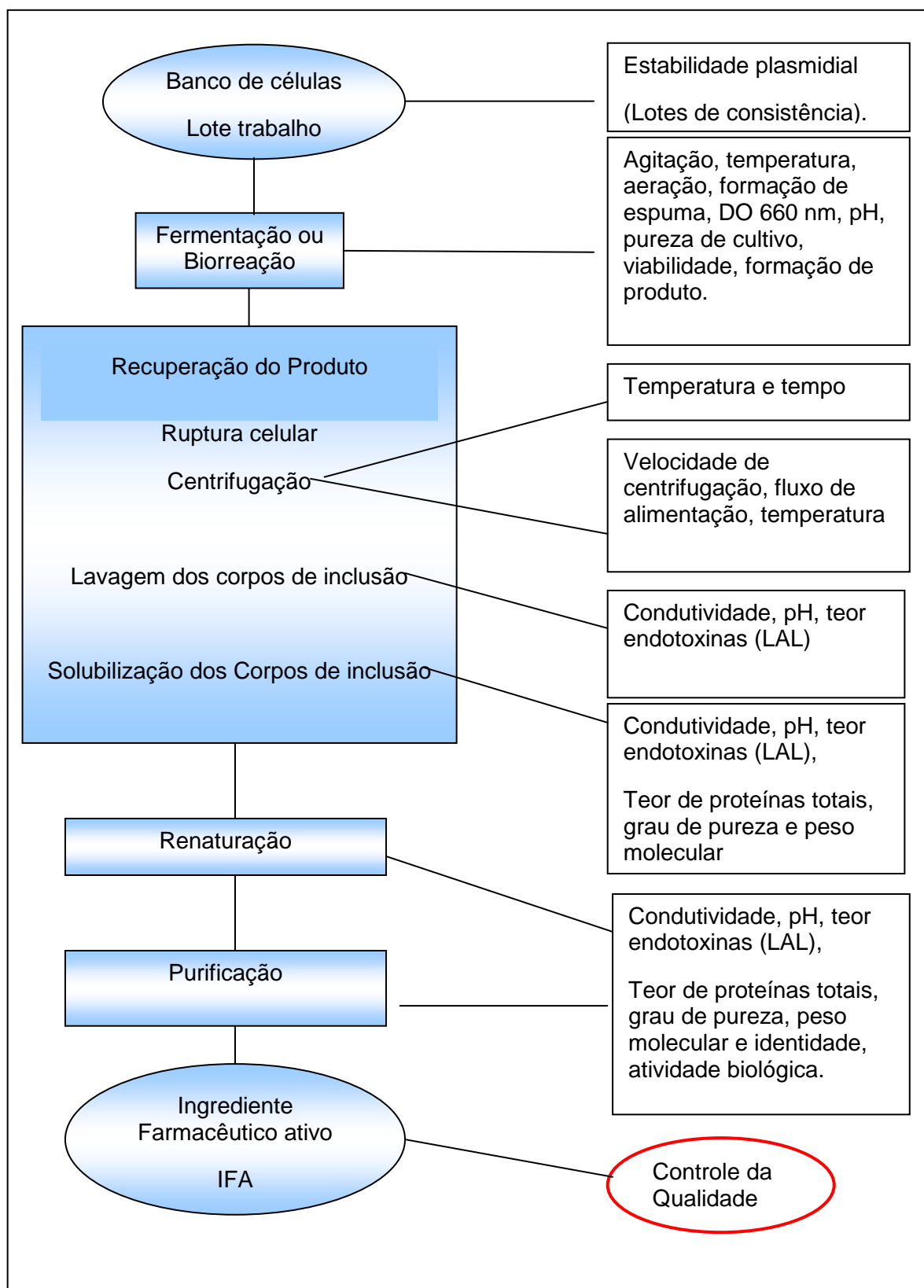


Figura 4.2 - Fluxograma das etapas do processo de produção do INF alfa 2b hu r e seus pontos críticos de controle. Fonte: Adaptado de Jungbauer et al. 2004 e Olson, 1985.

4.2 Métodos Analíticos

Conforme a tabela 4.1 foram propostas algumas metodologias analíticas a fim de monitorar o processo de produção. Estão disponíveis na literatura incontáveis tipos de métodos analíticos nos campos da química analítica e bioanalítica, bioquímica, biologia, biologia clínica e farmacologia (Taverniers et al. 2004).

As farmacopéias e guias das agências regulatórias estabelecem na monografia dos produtos biológicos algumas metodologias analíticas que devem ser adotadas para os produtos em análise. Aqueles métodos já publicados sofreram exaustivas pesquisas e avaliações como sensibilidade, robustez e limites de quantificação e de determinação.

A avaliação microbiológica durante a produção de injetáveis requer cuidados extremos com relação à contaminação microbiana. Os produtos devem estar livres de contaminantes e são testados quanto à esterilidade bacteriana e fúngica. Em produtos termossensíveis, não é possível realizar a esterilização por calor ou através de filtração esterilizante e por isso é preciso conduzir as atividades em ambientes livres de contaminações, ou seja, áreas classificadas e monitoradas quanto ao número de partículas totais e viáveis no ambiente. São realizadas ações padronizadas e monitoradas de forma a minimizar os riscos de contaminação. A cada etapa de processo investiga-se a carga microbiana e o teor de endotoxinas nas soluções de processo e, em alguns casos, até mesmo nos produtos em processo.

A seguir, uma breve descrição das metodologias analíticas propostas na tabela 4.1.

4.2.1 Estabilidade plasmidial

A estabilidade plasmidial é executada como um controle do lote de trabalho, em geral designado como matéria-prima e, portanto analisado pelo controle da qualidade. A verificação a cada lote processado é útil para a rastreabilidade do processo. Trata-se de verificar se o microrganismo mantém o plasmídeo geneticamente modificado em seu interior. Em algumas construções recombinantes existe um gene de seleção que codifica a resistência a antibióticos, este mecanismo pode ser utilizado para a seleção dos recombinantes, pois um meio que contenha tais antibióticos somente os microrganismos com plasmídeo que contêm o gene da resistência ao antibiótico serão capazes de se desenvolver. A evidência é o

crescimento microbiano característico em placas contendo meio nutriente. A razão entre o número de colônias formadas em meio contendo antibiótico e meios sem antibióticos na composição definirão, por análise estatística, se a cultura é estável (Garnick et al. 1998).

4.2.2 Pureza do cultivo

Utiliza-se a observação ao microscópio óptico de esfregaços dos cultivos corados pelo método de Gram. O analista deve procurar exaustivamente em diversos campos da lâmina corada por microrganismos com propriedades morfotintoriais diferentes daquelas do microrganismo em propagação. Assim, pode-se afirmar, com uma busca relativamente rápida, que o cultivo está livre de outros microrganismos que não aquele que está sendo cultivado. Outra prova de pureza utilizada é a semeadura em ágar nutriente. Visualizam-se as colônias e estas, sendo de um único organismo, apresentam morfologia colonial semelhante.

4.2.3 Carga microbiana

Realizada nos tampões de processo, ou água de rinsagem de sistemas cromatográficos, tem por objetivo monitorar a contaminação bacteriana. Pode ser conduzida por meio da filtração em membrana de porosidade equivalente a 0,22 µm. As bactérias ficam retidas no filtro e este é semeado em meio de cultivo e incubado entre 30°C e 35°C por 48 horas (USP 30 NF25, 2007).

4.2.4 Teor de endotoxinas

O teor de endotoxinas é avaliado a fim de se monitorar a quantidade de lipopolissacarídeos oriundos do microrganismo *E. coli*. Utiliza-se a técnica *in vitro*, em substituição do ensaio *in vivo*, realizado em coelhos. A grande vantagem do método *in vitro*, ou LAL (lisado de amebócitos de *Limulus*), é o tempo de análise, bastante reduzido, quando comparado com o ensaio *in vivo*. Estão disponíveis vários métodos, como cinético, enzimático e gel clot. Atualmente, existe oferta de sistemas de teste portátil (PTS) para o ensaio, em que os resultados são obtidos em até 15 minutos (USP 30 NF 25, 2007).

4.2.5 Peso molecular e pureza de proteínas por eletroforese

A técnica de eletroforese baseia-se na carga elétrica intrínseca das moléculas proteicas. Quando se aplica um campo elétrico em uma solução contendo proteínas, estas moléculas migram na direção oposta à da carga elétrica. A distância percorrida reflete a sua dimensão (massa molecular) e carga elétrica total.

A estrutura terciária de uma proteína, ou seja, sua conformação nativa apresenta-se enovelada. Sob condições de desnaturação, a estrutura molecular é quebrada, permanecendo somente a estrutura primária, portanto, todos os espécimes encontram-se em condições semelhantes e todas as proteínas em uma determinada solução assumem a mesma carga líquida intrínseca, negativa, e migram para o polo positivo, ocorrendo o deslocamento com velocidade maior das proteínas menores e o deslocamento menor daquelas maiores (Silva Jr, 2001).

4.2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase reversa (HPLC-RP)

Outras técnicas também são capazes de definir a pureza de uma proteína, além de quantificá-la. Segundo Zarrin e colaboradores (2006), o método de cromatografia de alta eficiência aplica princípios da fase reversa e pode ser utilizado como alternativa. Este método é desenvolvido em torno de 20 minutos para cada amostra. Há que se preocupar com padrões, para quantificar a proteína, além de material de referência estabelecido, a fim de se avaliar o desempenho do ensaio. A detecção do analito é dada investigando-se o comprimento de onda na faixa do ultravioleta.

4.2.7 Ensaio imunoenzimático (Elisa)

Um método utilizado na detecção, identidade e quantificação da proteína é aquele denominado de ensaio imunoenzimático. Esta metodologia consiste na ligação específica entre antígeno e anticorpo, e este último, conjugado a uma enzima, desenvolve coloração de intensidade compatível com o número de ligações específicas. Requer um anticorpo monoclonal preparado exclusivamente para o

ensaio.

4.2.8 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar é um método demonstrado por Fujiwara & Honda (1987), citado por Altri (1998), e consiste na separação de espécimes em uma solução de acordo com a carga elétrica do analito. Tem sido realizado com sucesso na indústria farmacêutica por apresentar uma agilidade de resposta analítica, em amostras contendo proteínas e peptídeos. O método de eletroforese capilar em gel filtração é utilizado para estimar o tamanho molecular dos espécimes proteicos (USP 30, 2007).

4.2.9 Determinação de proteínas totais: Método colorimétrico segundo Lowry:

A metodologia para a determinação de proteínas, conforme Lowry e colaboradores (1951), baseia-se na complexação dos grupamentos aminoterminais com íon cobre em pH básico. Após a adição do reagente Folin-Ciocalteus, ocorre a formação de sais de molibdato-tungstênio, desenvolvendo coloração azulada, de intensidade proporcional à concentração de proteínas no meio. A medida é realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda em 750 nm.

4.2.10 Western Blot

Também denominado imunodeteção de proteínas em membranas de nitrocelulose, este método é utilizado na detecção de proteínas e em extratos proteicos crus e caracterização de proteínas recombinantes. Tem por princípio detectar pequenas quantidades de proteínas adsorvidas em uma membrana de nitrocelulose que reagiram com anticorpos específicos para a proteína em análise. Um anti-anticorpo conjugado a enzima peroxidase, por exemplo, é adicionada sobre a membrana. A ligação entre a proteína-anticorpo-anti-anticorpo conjugado à enzima, na presença de substrato, desenvolve coloração, o que evidencia a localização da proteína de interesse na membrana (Brígido, 2003).

4.2.11 Considerações

As metodologias apresentadas são correntemente utilizadas em laboratórios analíticos. A escolha dependerá do tempo destinado a cada análise, sensibilidade, robustez do método, além da repetitividade e reprodutibilidade, dados apresentados durante a validação analítica. O tratamento dos resultados e o estabelecimento do erro analítico possibilitará o conhecimento do grau de dispersão da medida e os ajustes na produção poderão ser realizados garantindo-se a qualidade do produto.

4.3 Modelo gerencial para o laboratório de controle em processo

A proposta de modelo de um laboratório de controle em processo está baseada nos requisitos gerenciais e técnicos preconizados pela GGLAS/ Anvisa e publicados como procedimento GGLAS 02/17025, partindo de critérios publicados na norma NBR:ISO/IEC17025, os quais primam pela excelência em laboratórios de calibração e ensaios. O procedimento 02 da GGLAS tem seu foco em laboratório analíticos em saúde e, portanto, tem aplicação direta no modelo proposto neste estudo, o biofármaco INF alfa 2b hur.

Cada requisito gerencial foi tratado e analisado criticamente. Verificou-se a sua aplicação alinhando-se aos procedimentos estabelecidos no Sistema de Garantia da Qualidade de Bio-Manguinhos, e como premissa básica o laboratório de controle em processo da vacina contra Hib. Nesta avaliação, apontam-se as sistemáticas que devem ser adotadas, propõem-se melhorias ou apontam-se necessidades de implantação de práticas, em virtude das particularidades do processo de produção do INF alfa 2b hur.

O procedimento 02 divide-se em cinco partes, sendo os requisitos técnicos referenciados na parte 4 e os técnicos na parte 5. Os critérios ou requisitos gerenciais estão descritos na tabela 4.2. Os requisitos gerenciais estão subdivididos em 14 itens e destinam-se a sistematizar ações para organização, registro e tomadas de ação gerenciais a fim de manter um alto padrão de qualidade para a atividade finalística, ou seja, ensaio e seu resultado.

Cada item foi brevemente discutido, no intuito de alinhar os procedimentos já existentes às necessidades elencadas segundo o procedimento GGLAS 02/17025. Uma proposta foi elaborada para aqueles itens cuja especificidade das atividades da produção de proteínas recombinantes esteja presente o que, portanto, exige a necessária adequação ou elaboração de novas sistemáticas para atendimento aos requisitos, bem como às particularidades do produto.

Tabela 4.2 – Critérios gerenciais apontados no procedimento GGLAS 02/17025

Requisito ou Critério	Descrição
4.1	Organização
4.2	Sistema da Qualidade
4.3	Controle de documentos
4.4	Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos
4.5	Subcontratação de ensaios e calibrações
4.6	Aquisição de serviços e suprimentos
4.7	Atendimento ao cliente
4.8	Reclamações
4.9	Controle de trabalhos de ensaio não-conforme
4.10	Ação corretiva
4.11	Ação preventiva
4.12	Controle de registros
4.13	Auditorias internas
4.14	Análise crítica pela alta gerência

Fonte: Procedimento 02/17025, Anvisa, 2003.

4.3.1 Critério 4.1 – Organização

Este item trata das questões organizacionais do laboratório; de tudo de que se necessita quanto às atribuições formalmente designadas e funções da unidade organizacional, ou seja, do laboratório de controle em processo.

A função do gerente da qualidade, neste caso, relaciona-se com aspectos técnicos do laboratório analítico, portanto é uma função bastante específica. O gerente da qualidade requer alto grau de conhecimento técnico-analítico. A pessoa designada para esta função, preferencialmente, não deve pertencer ao corpo técnico do laboratório analítico, evitando o conflito de interesses. Pode ser representada por uma pessoa pertencente ao quadro funcional da garantia da qualidade, para tratar dos assuntos relacionados à qualidade dos ensaios e ao sistema de gestão da

qualidade implantado no laboratório. O gerente do Departamento de Garantia da Qualidade, obviamente, deve ter conhecimento dos assuntos e ações tomadas pelo gerente da qualidade designado por ele, para o controle em processo. Entende-se como gerente da qualidade um representante do Departamento de Garantia da Qualidade (Degaq), que a partir da estrutura organizacional, na qual estão estabelecidos os níveis hierárquicos da organização, perpassa todas as atividades que envolvem a execução das tarefas inerentes ao controle em processo, bem como suas interfaces.

Além da estrutura organizacional, as responsabilidades e atribuições do corpo técnico (e do supervisor desta área), precisam ser definidas, e todos os envolvidos precisam ter conhecimento das mesmas. Esta premissa possibilita que cada funcionário realize suas atividades a contento.

Outro ponto importante é que o laboratório de controle em processo, na pessoa de seu gerente técnico, disponha de substitutos treinados e capazes de exercer as funções gerenciais na sua ausência. Esta necessidade se dá devido ao período de férias, treinamentos e/ou cursos, em que o gerente não esteja presente, porém há uma pessoa capaz de realizar a tomada de decisões e ações a fim de garantir a continuidade das atividades. Os clientes do controle em processo fazem parte da instituição e, portanto, estão em contato direto com o laboratório. Esta facilidade na troca de informações propicia a melhoria dos padrões de trabalho, pois o retorno do grau de satisfação é imediato. Tal quesito será tratado com maior profundidade nos próximos itens.

O conflito de interesses precisa ser evitado. Os resultados encontrados e investigados, caso evidenciem desvios, precisam ser divulgados ao cliente de forma imparcial e sem que haja tendências.

4.3.2 Critério 4.2 – Sistema da Qualidade

O sistema da qualidade determina que toda organização e funcionamento do laboratório estejam descritos em manual da qualidade, voltado para as atividades inerentes ao controle em processo.

O laboratório de controle em processo, formalmente designado na unidade, destinado ao controle da vacina contra Hib não possui a sistemática padronizada, embora esta tenha sido prevista, encontrando-se na fase de projeto. Vários itens

deste requisito já estão contemplados como parte das ações da garantia da qualidade de Bio-Manguinhos. Como proposta para o controle em processo do novo laboratório destinado à produção de interferon alfa 2b hu-r alguns procedimentos têm papel de manter o corpo técnico motivado e orientado para alcance dos resultados. São eles:

- a) Criação do manual da qualidade;
- b) Designação de gerente da qualidade;
- c) designação de um gerente técnico, que naturalmente deve ser o supervisor da área;
- d) responsabilidades e atribuições claramente definidas e formalmente estabelecidas;
- e) Criação da política da qualidade, alinhada à missão e valores da organização sem, no entanto entrar em conflito com a política institucional.

4.3.3 Critério 4. 3 – Controle de documentos

O controle de documentos refere-se ao procedimento de emissão, controle da distribuição e recolhimento das versões aos usuários. Este critério elenca os requisitos necessários para que seja efetivo o controle da documentação do sistema da qualidade.

Para o laboratório a ser implantado sugere-se seguir as diretrizes do Sistema de Garantia da Qualidade em Bio-Manguinhos, o qual já possui um procedimento que trata do controle dos documentos internos da unidade e está codificado como DI 0001. Todos os procedimentos emitidos na unidade precisam ser verificados e formatados pela Garantia da Qualidade. Há também uma lista mestra dos documentos emitidos por todas as unidades que compõem Bio-Manguinhos. Alguns deles encontram-se disponíveis em meio eletrônico, porém não há um procedimento formal para controle das atualizações. Conforme estabelecido no DI 0001, os procedimentos e instruções de trabalho têm validade por três anos. Os documentos obsoletos precisam ser devolvidos à Garantia da Qualidade. O controle de distribuição e devolução é feito por meio de guias de distribuição e recolhimento, nas quais constam o nome e a data de distribuição. Há controle de revisão e alterações,

portanto, este procedimento está de acordo com as exigências do procedimento GGLAS 02/17025. Não é permitida alteração manuscrita da documentação da qualidade. Assim, qualquer alteração em procedimentos deverá ser registrada e emitida nova revisão do documento o mais breve possível.

4.3.4 Critério 4.4 – Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos

É necessário fazer análises críticas das solicitações feitas pelos clientes para que se planejem as condições estruturais e os recursos disponíveis para o processamento das análises.

Como o laboratório de controle em processo para a vacina Hib já possui definidos os pontos de controle e metodologias analíticas, o número de amostras e ensaios esperados é discutido quando é proposto o cronograma de produção, em geral para períodos de um ano. A mesma diretriz deve ser adotada, uma vez que a demanda é ajustada junto ao Ministério da Saúde.

Há planejamento prévio na unidade em que são avaliados itens de insumos e equipamentos necessários para o cumprimento do cronograma de trabalho. O planejamento engloba desde a aquisição de insumos em quantidades suficientes, horas extras para os funcionários em caso de necessidade, adequação dos procedimentos e metodologias de ensaios, programas de manutenção de equipamentos, programa de calibração de instrumentos de forma que seja realizado o pleno atendimento o cronograma.

Como são discutidos em reuniões ordinárias entre o planejamento e produção, os registros das tomadas de decisão são feitos em atas de reunião.

Em casos específicos, quando ocorrem mudanças no processo de produção, as reuniões prévias são requeridas com intuito de mapear a inserção de pontos críticos de controle, além de se avaliar as condições de execução de novos ensaios ou de acréscimo de amostras.

4.3.5 Critério 4.5. – Subcontratação de ensaios e calibrações

Devido à necessidade de resposta rápida à produção, a subcontratação de serviços não é uma prática comum na rotina laboratorial. Uma vez que o laboratório

está estruturado para atender à demanda interna, não é necessário prever subcontratação de ensaios. Porém, em casos excepcionais (como, por exemplo, na caracterização de produtos), admite-se a subcontratação de ensaios que demandam uso de equipamentos sofisticados e de alto custo. A subcontratação deve estar atrelada a um contrato e a competência do laboratório contratado precisa estar validada.

Em caso de subcontratações, mantêm-se registros dos resultados obtidos para rastreabilidade. É o caso da calibração e qualificações de instrumentos realizados pelo Laboratório de Metrologia e Validação (Lamev), que em suas interfaces trabalha com fornecedores de serviço que pertencem a RBC (Rede Brasileira de Calibrações).

Por fim, a análise crítica pela alta administração deve ser conduzida para aprovação ou rejeição dos laboratórios que porventura precisem ser contratados para eventuais serviços.

4.3.6 Critério 4.6 – Aquisição de serviços e suprimentos

Uma das causas dos erros analíticos pode ser a qualidade das matérias-primas destinadas às análises quimiométricas. Desta forma, são necessários procedimentos que garantam a qualidade dos insumos para resposta adequada ao ensaio.

Existe sistemática implementada para o Lamev, através da DI 0013, que trata da aquisição de materiais ou serviços, além daquela estabelecida para o controle da validade dos insumos, DI 0481. A adoção destes procedimentos atende aos critérios estabelecidos no GGLAS 02/17025 e não ferem o sistema da qualidade em curso. Há também uma preocupação com relação à aquisição de itens pelo serviço público, o qual segue a Lei n. 866 – que estabelece a aquisição de materiais e insumos a partir de licitação e menor preço.

A avaliação prévia dos fornecedores, e sua qualificação encontram-se padronizada para a unidade, embora nem todos os serviços e insumos sofram inspeção prévia. Desta forma, sugere-se seguir as diretrizes já implantadas para o novo laboratório.

4.3.7 Critério 4.7 – Atendimento ao cliente

Este item contempla a interface com os clientes e o pleno atendimento às suas solicitações. Uma vez que o cliente para o controle em processo é a própria produção, a interface encontra-se facilitada. Os registros das discussões em reuniões, pertinentes ao grau de satisfação dos clientes, precisa ser mantido e as ações tomadas podem ser monitoradas periodicamente, a fim de se evidenciar se ações propostas foram cumpridas e se as melhorias implementadas satisfazem às necessidades dos clientes. Com esta sistemática, apuram-se as causas, avalia-se a procedência, com alimentação de dados para melhoria das ferramentas de gestão.

Atualmente, o Lamev realiza pesquisas de satisfação de clientes e há sistemática padronizada para a coleta de informações dos usuários e tratamento dos dados levantados. O procedimento está descrito no DI 0016. A adoção deste padrão é interessante para o novo laboratório, pois é capaz de fornecer respostas rápidas visando à melhoria do fluxo das informações entre controle em processo e produção (cliente), entendendo-se as diferentes etapas da produção e intercorrências que possam existir relativas aos resultados encontrados.

4.3.8 Critério 4.8 – Reclamações

Este critério trata das relações entre cliente e laboratório no que tange os prazos para entrega de resultados, grau de assertividade do laboratório e confiabilidade metrológica. Qualquer reclamação precisa ser investigada, suas causas apuradas e um tratamento adequado proposto e executado. As ações tomadas precisam ser monitoradas e registradas.

É necessário um procedimento que venha a padronizar o tratamento dispensado às reclamações de clientes. Um registro igualmente padronizado permite que todos os dados e ações sejam devidamente mantidos. Apesar de o cliente ser único, este processo possibilita retroalimentar o sistema da qualidade, com a promoção de melhorias contínuas. Uma das maneiras de ser realizado é criar um procedimento com as instruções acerca do registro da reclamação. A ferramenta pode ser elaborada através de planilha ou quadro informativo. E deve estar disponível ao departamento de modo que os usuários tenham acesso.

4.3.9 Critérios 4.9, 4.10 e 4.11 – Controle de trabalhos de ensaio não-conforme, ação corretiva e preventiva

Estes itens serão tratados em conjunto, uma vez que se referem a um mesmo assunto: as não-conformidades e suas ações.

Eles determinam quais as ações devem ser tomadas em caso de evidência de não-cumprimento de um requisito estabelecido. São propostas ações corretivas no intuito de que medidas eficazes sejam tomadas de modo que as causas da não-conformidade sejam eliminadas e não tornem mais a ocorrer, ou que sejam implantadas melhorias ao processo, de modo a prevenir possíveis não-conformidades.

A sistemática implantada em Bio-Manguinhos para registro e tratamento de não-conformidades está estabelecida no DI 0002: Abertura de relatório de melhorias e não-conformidades, investigação e tomada de ações preventivas e corretivas. A adoção deste procedimento é obrigatória para todos os departamentos e laboratórios de Bio-Manguinhos. É utilizado para averiguar as causas, quando as ações são previamente discutidas entre os envolvidos, sendo as discussões, mediadas pela garantia da qualidade. Internamente, nos laboratórios de controle em processo, esta sistemática vem auxiliar e contribuir com o sistema da qualidade da unidade. Através da investigação e acompanhamento, o Degaq monitora as ações corretivas adotadas, com o registro das ações tomadas, bem como a definição dos responsáveis e seus prazos.

De acordo com o mesmo procedimento existem ações preventivas ou de melhoria. São tomadas ações de modo proativo, sem que tenham ocorrido previamente falta de cumprimento a um requisito ou procedimento estabelecido. Estas ações podem advir de relatórios de inspeção, como recomendações, ou, ainda, a partir de discussões técnicas, reuniões de análise crítica do sistema da qualidade ou de assuntos técnicos. O registro é disponibilizado na instituição por meio da intranet.

É obrigatório treinamento para o corpo técnico envolvido com o controle em processo neste procedimento, a fim de que a ferramenta seja bem aplicada e utilizada com o intuito de retroalimentar o sistema da qualidade proposto.

O documento DI 0014, estabelecido pelo Departamento de Controle de Qualidade (Dequa), refere-se ao gerenciamento de resultados inválidos ou fora de especificações, e determina a sistemática para gerenciamento dos mesmos. A implantação do procedimento permite delimitar o número de repetições que podem

ser realizadas para um determinado parâmetro analítico. Possibilita maior agilidade na entrega dos resultados, mas é importante que outras ferramentas sejam utilizadas a fim de validar os ensaios realizados.

O documento *Out of Specification – OOS* - (1998) estabelece diretrizes para avaliação dos resultados fora da especificação preconizada. São seis etapas para uma breve investigação e posterior tomada de decisão.

1. Discutir o método com o analista; confirmar o desempenho e o conhecimento do analista de acordo com o procedimento previamente estabelecido.
2. Examinar os dados brutos obtidos durante as análises, incluindo-se cromatogramas, espectros, identificando informações anômalas ou suspeitas.
3. Confirmar o desempenho dos instrumentos.
4. Determinar o padrão de referência apropriado, solventes, reagentes, e outras soluções que, quando utilizadas, estejam de acordo com as especificações.
5. Avalie o desempenho do método para garantir que a execução está de acordo com os padrões requeridos baseados nos dados de validação analítica.
6. Emitir parecer documentado, com a aceitação ou rejeição do ensaio.

Resultados fora das especificações requerem investigações junto ao laboratório analítico e alguns critérios precisam ser cuidadosamente avaliados. Equipamentos, materiais, insumos, reagentes, analistas, além de observação clara do processo, a fim de evidenciar tendências e desvios de produção.

4.3.10 Critério 4.12 – Controle dos registros

O controle de registros prevê a padronização das memórias e dados gerados durante as atividades inerentes ao laboratório. Muitas diretrizes já se encontram estabelecidas no Sistema de Gestão da Qualidade que vigora na unidade. O DI 0003 – Controle de Registros – padroniza este procedimento para unidade. Os dossiês de produção e os dados relativos aos ensaios de controle em processo são armazenados no Degaq. Os dados brutos são mantidos nos arquivos, em planilhas eletrônicas, no departamento de origem para consulta.

A disposição dos registros de produção e tempo de guarda fica a cargo do Degaq, que mantém um arquivista a fim de controlá-los. As diretrizes das boas

práticas de fabricação preveem os registros técnicos de maneira semelhante à preconizada pelo procedimento GGLAS 02/17025.

Os boletins de análise preenchidos pelo laboratório de controle em processo para produção de vacina contra Hib cumprem atualmente todos os requisitos expostos. Os resultados gerados para o controle em processo não são expressos com a incerteza de medição, entretanto, os requisitos técnicos do procedimento preconizam o uso do cálculo de incerteza de medição.

O plano de amostragem deverá garantir que a amostra representa o todo. Segundo Triola (1998), quando se trata de amostragem de número de frascos ou recipientes finais, utiliza-se a fórmula: $N^{0,5}$, em que N é o número de recipientes finais. Este estudo estabelece as diretrizes para o controle em processo compreendido entre a biorreação e a obtenção do ingrediente farmacêutico ativo (IFA), ou seja, a amostragem deve ser efetuada no produto a granel. No caso do IFA, há um único recipiente ou lote e, portanto, um tratamento estatístico destinado a produtos produzidos em batelada e acondicionados em um único frasco ou recipiente. Deve-se avaliar o todo a partir do quantitativo de amostras para os ensaios preestabelecidos, acrescidos de amostras para retenção ou amostras de arquivo. Tais amostras são destinadas a reanálise ou contraprova, no caso de dúvidas relacionadas ao resultado final. As amostras de arquivo de controle em processo devem permanecer sob guarda do controle em processo.

4.3.11 Critério 4.13 – Auditorias internas

As auditorias ou inspeções são a evidência de que o sistema e suas sistemáticas são adotados na organização ou laboratório. Trata-se das evidências objetivas de que o sistema da qualidade implantado é eficaz (RDC n.210, 2003).

A sistemática para auditorias internas está estabelecida na Divisão de Garantia da Qualidade (Digaq) através do DI 0004. Porém, o procedimento refere-se ao sistema da qualidade com base nas boas práticas de fabricação. Há necessidade de se estabelecer o documento a partir do procedimento GGLAS 02/17025, para o preparo de planejamento da auditoria, além de formação técnica para os auditores internos da qualidade. O procedimento GGLAS n. 5 estabelece os critérios para a realização de auditorias e análise crítica do sistema da qualidade dos laboratórios.

Tal procedimento poderá servir como base para introdução e padronização da sistemática para avaliação dos laboratórios de controle em processo.

A interface entre o controle em processo e o Degaq, por intermédio da Divisão de Auditoria, precisam ser estreitados, pois as inspeções preveem itens particulares, inerentes ao procedimento GGLAS 02/17025. É necessário capacitar auditores internos da qualidade para a realização de auditorias de processo (ocasião em que um ensaio será realizado na presença dos auditores).

4.3.12 Critério 4.14 – Análises críticas pela gerência

O cumprimento deste item leva a uma reflexão sobre as ações tomadas e a condução dos serviços prestados pelo controle em processo. A partir da análise crítica promovem-se melhorias no sistema implantado.

A análise crítica do Sistema de Gestão da Qualidade (DI 0005) estabelece a sistemática para avaliação das reuniões de análise crítica do sistema da qualidade. Todos os registros da qualidade, como relatórios de não-conformidade, resultados de programas interlaboratoriais, estimativas de incerteza, validação de metodologias, reclamações de clientes, pesquisa de satisfação de clientes devem ser tratados nestas reuniões, além de qualquer outro assunto relativo à qualidade dos resultados ou produtos. Devem fazer parte destas reuniões pelo menos o gerente da qualidade do laboratório, o supervisor ou gerente técnico, o gerente do departamento de produção e garantia da qualidade. Durante a implantação do sistema, a frequência de reuniões deve ser, no mínimo, semestral ou trimestral.

Os registros devem ser feitos em atas de reunião e as tomadas de ação precisam ser monitoradas, a fim de evidenciar a eficácia do sistema. Estes itens devem ser incluídos nos procedimentos existentes.

4.4 Requisitos técnicos

Os requisitos técnicos estão relacionados às questões que influenciam na qualidade das medições, como fatores humanos, ambiente, equipamentos, metodologia e documentação. São cinco as principais causas de erros, e se foram trabalhadas de maneira proativa eles podem ser contornados de modo a evitar

falhas e, por conseguinte, garantir a qualidade dos produtos. Dessa forma, será dada ênfase aos requisitos técnicos com base nas propostas em conjunto entre dados de literatura e o sistema da qualidade implementado em Bio-Manguinhos.

A tabela 4.3 relaciona os dez critérios relativos aos requisitos técnicos preconizados no procedimento GGLAS 02/17025.

Tabela 4.3– Requisitos técnicos apontados no procedimento GGLAS 02/17025.

Requisito ou critério	Descrição
5.1	Fatores que influenciam a qualidade das medições
5.2	Pessoal
5.3	Acomodações e condições ambientais (instalações)
5.4	Métodos de ensaio e validação de métodos
5.5	Equipamentos
5.6	Rastreabilidade
5.7	Amostragem
5.8	Manuseio de amostras
5.9	Garantia da qualidade de resultados de ensaios
5.10	Apresentação de resultados

Fonte: Procedimento GGLAS 02/17025 (Anvisa, 2003).

4.4.1 Critério 5.1 – Fatores que influenciam a qualidade das medições

Muitos são os fatores que influenciam a qualidade das medições. Destacam-se o ambiente, a amostragem, insumos, pessoal, equipamentos, métodos analíticos. A rastreabilidade das ações tomadas, bem como a qualificação dos equipamentos, treinamento de pessoal. As validações analíticas devem ser prontamente rastreáveis.

4.4.2 Critério 5.2 – Pessoal.

Os fatores humanos são parte essencial da qualidade dos resultados, pois os ensaios são realizados por técnicos treinados e capacitados para tal função. Segundo o procedimento GGLAS 02/17025, é necessário pessoal suficiente, com formação adequada, treinamento, competência técnica e experiência para exercer as funções designadas. A legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação (RDC

n. 210, 2003) preconiza, também, a necessidade de pessoal em quantidade suficiente e habilitado para desempenhar as atividades designadas no laboratório. Portanto, buscou bibliografia complementar para o completo entendimento dos critérios relevantes à confiabilidade dos resultados analíticos.

Competência é definida como o conjunto de conhecimentos, habilidades e atitudes que justificam alto desempenho. Há que se considerar que os melhores desempenhos estão fundamentados na inteligência e na personalidade das pessoas (Fleury & Fleury, 2004).

As competências individuais vão além da qualificação do indivíduo. A figura 4.3 representa as forças das competências, que alia os conhecimentos, ou seja, a formação, habilidades e atitudes do indivíduo.

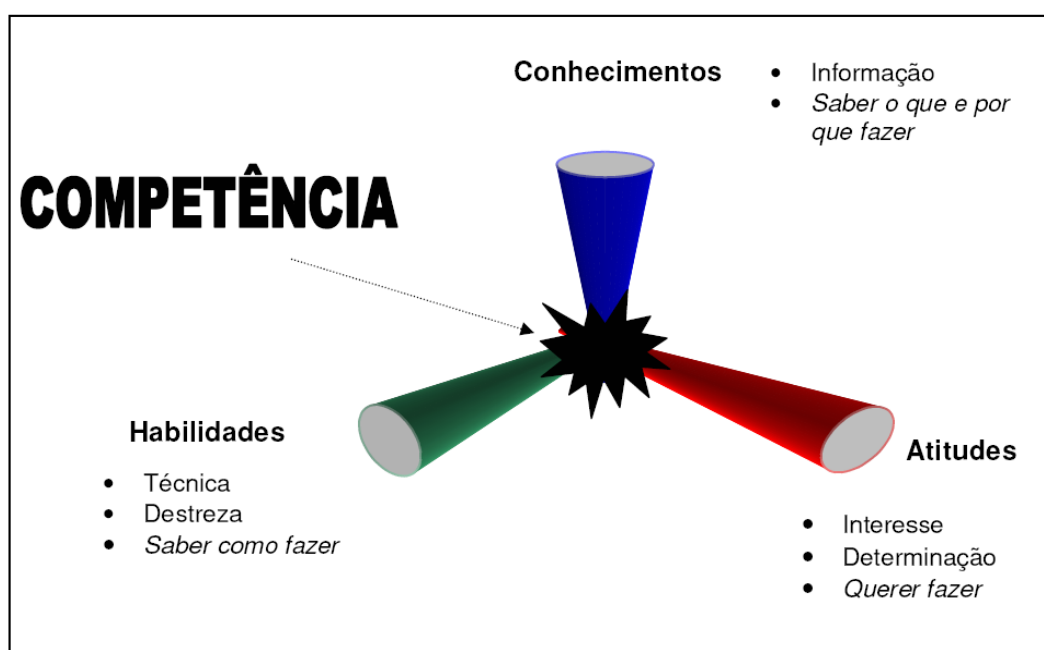


Figura 4.3 – As forças das competências. Fonte: Brandão & Guimarães, 2001.

Caracterizar os recursos de competência para a atividade de controle em processo requer que sejam mobilizadas as competências individuais necessárias para o cumprimento das atividades com agilidade e confiabilidade. Além dos conhecimentos adquiridos na formação, sobre o ambiente operacional, o indivíduo também necessita ter habilidade quanto ao saber-fazer e atributos ou competências intangíveis: Saber ser / agir (Ruas, 2005).

A partir das atividades elencadas avalia-se a demanda do controle em processo do IFN alfa 2b hu-r. Os conhecimentos técnicos e a formação dos indivíduos devem ser levados em consideração na captação do corpo técnico,

porém há outros atributos que precisam também ser avaliados. A denominada 'competência metodológica' é considerada a capacidade autônoma de encontrar novos caminhos na solução de tarefas complexas e poder transferir a competência adquirida para novas situações. E há também a competência dita 'social'. Nesta, o indivíduo demonstra a habilidade e comunicar-se com o grupo, além de cumprir tarefas dividindo-as com um grupo de trabalho (Market, 2000).

O dimensionamento do quadro funcional é proposto com base em tempos e movimentos, a partir da natureza das atividades realizadas e também no tempo que deve ser despendido para sua realização. Como o modelo proposto destina-se a laboratório de controle em processos do produto IFN alfa 2b hur, a produção do biofármaco em Bio-Manguinhos encontra-se atualmente na fase de transferência de tecnologia, não havendo, no presente momento, obtenção do produto concentrado nas instalações industriais da Instituição. As entradas de amostras diárias para o laboratório, bem como a estimativa de tempo necessário para execução dos ensaios incluindo-se o preparo das amostras foram feitos com base no conhecimento prévio de algumas técnicas empregadas em outros modelos como, por exemplo, o adotado pelo controle em processo destinado à produção da vacina contra Hib. Devem ser previstos períodos de descanso entre as atividades e dos funcionários, inclusive a possibilidade de assumir, em casos extremos, funções de outros, para que a rotina de trabalho não seja comprometida quando ocorrem licença médica ou impossibilidade de atuação de determinado colaborador (Slack et al. 2002). O planejamento das atividades e a avaliação crítica de resultados devem estar a cargo do gerente técnico, conforme preconizado no item de Organização já mencionado.

A função do gerente técnico no controle em processo é fundamental para planejamento das ações, priorização das atividades, além de avaliar criticamente os resultados, não-conformidades e suas causas.

A formação básica e a capacitação necessária ao quadro funcional destinado a realizar estas atividades de controle em processo são trabalhadas a partir da reflexão dos tipos de metodologias analíticas empregadas.

Técnicas analíticas microbiológicas precisam ser aplicadas durante a biorreação, no entanto, algumas demandam tempo de incubação que variam entre cinco a 14 dias, porém, o tempo dispensado pelo analista para execução da tarefa é menor.

Há que se levar em consideração o controle dos equipamentos e registros nos documentos como tempo de execução das análises.

A capacitação do corpo funcional do controle em processo deve ser planejada e dimensionada considerando-se as metodologias de análise, e também em procedimentos de avaliação, validação e estatística. As metodologias de análise e procedimentos fazem parte da qualificação do funcionário para executar suas atividades. Este treinamento é compulsório e garantirá a correta aplicação dos padrões de trabalho previamente estabelecidos. Os treinamentos precisam ser registrados. Esta é a evidência de que o treinamento ocorreu e o técnico encontra-se capacitado a realizar o ensaio.

Os treinamentos inerentes à aplicação de técnicas estatísticas, avaliação de tendências, novas técnicas para aplicações futuras, formação em biologia molecular, novas metodologias analíticas, reciclagem e atualizações precisam ser previstos e observados como meta do laboratório. Treinamentos compulsórios em boas práticas de produção e biossegurança precisam ser planejados e de fato realizados. Trata-se de noções básicas do negócio da organização, produção de biológicos ou biotecnológicos. Assim, os treinamentos nos documentos do sistema de gestão da qualidade devem ser condicionais para o cumprimento das ações de produção.

A partir da qualificação em serviço dos profissionais identificam-se as lacunas do pessoal técnico, para compor o planejamento de treinamentos externos e avaliação de seu aproveitamento e definir metas anuais para treinamento e melhoria da qualidade dos serviços.

A captação de recursos humanos pode ser feita fora da organização ou procedendo-se ao aproveitamento de competências internas. A avaliação deste processo é fundamental na decisão tomada pelo gerente da área de biofármacos – hoje esta função é desempenhada pelo gerente do projeto, até a completa nacionalização do produto-alvo de transferência de tecnologia.

Com os pontos críticos de controle e suas metodologias analíticas estabelecidas, foi criada uma matriz, apresentada na tabela 4.4, na qual se relacionam as características pessoais e formação técnica para constituir a equipe que atuará nas atividades de controle em processo do laboratório analítico. A proposta para este modelo inclui dois técnicos, um tecnologista e um supervisor para área, que vem a ser o gerente técnico. A equipe formada precisa ser qualificada nos princípios das metodologias empregadas e receber treinamento específico nos ensaios relacionados. Tais treinamentos estão dentro do escopo da transferência de tecnologia. Ainda precisa ser prevista a qualificação em estatística e ferramentas da qualidade e nos cumprimentos do procedimento GGLAS 02/17025 e boas práticas

de fabricação. Há ferramentas em Bio-Manguinhos para previsão dos treinamentos com a disponibilização de recursos para sua execução. Esta sistemática está padronizada para a seção de calibração (Secal), pertencente ao Lamev. Trata-se da instrução de trabalho codificada como DI 0019 – Programação de treinamento para o Secal. Podem-se utilizar as diretrizes gerais da instrução a fim de construir um procedimento para o controle em processo. É também importante o levantamento das necessidades de treinamentos e disponibilização de recursos a partir da discussão prévia em reuniões de análise crítica com a alta administração. Desta maneira é possível avaliar as necessidades de treinamento, priorizar aquelas emergenciais e capacitar o grupo de forma homogênea, bem como aquelas advindas de ações tomadas a partir de não-conformidades ou oportunidades de melhorias. São compulsórios os treinamentos inerentes à documentação interna do sistema da qualidade. Trata-se do sistema treinamento e qualificação em serviço (TQS).

É preciso também estabelecer a sistemática formalizada para amostragem. O controle em processo, no modelo da vacina Hib, não realiza as amostragens. Esta responsabilidade é da produção, em virtude das amostras que serão retiradas do volume total do produto ainda em processo, é um técnico da área que realiza a coleta do material para ensaio. Entretanto, é necessário estreitar-se as interfaces com as unidades de controle da qualidade e produção, de forma a estabelecer um plano de amostragem representativo do lote.

O acesso às áreas do laboratório deve ser restrito ao quadro de funcionários do laboratório e estes passam por avaliação prévia.

É necessário um documento formal designado às atribuições técnicas e gerenciais para o controle em processo, bem como uma lista de assinaturas e rubricas, a fim de se possuir conhecimento prévio das responsabilidades do corpo técnico envolvido, bem como das atividades ali desenvolvidas.

A tabela 3.4 foi criada a partir de um consenso com os dados de literatura encontrados e estabelece os perfis necessários para os integrantes da equipe de um laboratório analítico, levando-se em considerações a competência técnica e comportamental. No entanto, além das competências necessárias apontadas é importante que sejam previstos treinamentos periódicos para reciclagem e melhoria contínua.

Tabela 4.4 – Atributos técnicos e comportamentais para o novo laboratório de controle em processo

Atividades	Atribuições	Competências técnicas	Competências comportamentais		Tempo dispensado em cada análise
			Competência metodológica	Competência social	
Gestão e organização laboratorial	Avaliação dos resultados, utilização de ferramentas estatísticas.	Formação básica em Química, Engenharia Química, Farmácia, Biologia, Microbiologia e Biotecnologia.	Altamente desenvolvida, criatividade para conceber e implementar processos.	Altamente desenvolvida. Liderança e habilidade de comunicação. Interfaces com equipe de engenharia, produção, controle da qualidade, validação.	Período necessário para avaliação de dados brutos, resultados, aplicação de técnicas estatísticas.
Ensaio microbiológicos	Realização de ensaios microbiológicos	Domínio de técnicas em microbiologia. Formação técnica em Microbiologia, Biologia ou Farmácia.	Alta capacidade concentração, organização e habilidade manual. Capacidade de reproduzir procedimentos, receber e executar instruções. Capacidade de executar tarefas em áreas de contenção.	Capacidade de interagir com os técnicos da etapa de produção para amostragem e utilização do espaço de contenção microbiológica.	Período de execução curto. Preenchimento de registros e interfaces com manutenção e calibração de instrumentos utilizados na área de contenção.
Ensaio físico-químicos	Realização de ensaios físico-químicos e estimativa de incerteza de medição.	Domínio de técnicas analíticas. Formação técnica em Química, Biologia ou Farmácia.	Capacidade de concentração, organização e habilidade manual de reproduzir instruções e receber orientações.	Alta capacidade de comunicação com as interfaces; engenharia, validação, calibração de instrumentos, clientes internos.	Dependem dos métodos analíticos. Algumas dosagens podem ter seu tempo de incubação. Sendo finalizadas algum tempo depois.

Tabela 4.4 – Atributos técnicos e comportamentais para o novo laboratório de controle em processo (continuação)

Atividades	Atribuições	Competências técnicas	Competências comportamentais		Tempo dispensado em cada análise
			Competência metodológica	Competência social	
Bioanalítico	Realização de ensaios bioanalíticos como Elisa, SDS-Page.	Formação básica em Microbiologia, Biologia, Química ou Farmácia tendo como diferencial: conhecimentos específicos em Biologia Molecular, incerteza de medição.	Capacidade de concentração, organização, paciência e detalhismo, além de habilidade manual, para reproduzir instruções e receber orientações.	Alta capacidade em comunicação com as interfaces: validação, controle da qualidade, cliente(produção), calibração de instrumentos de medição.	Período maior de ensaio que as demais demandas, pois há preparo de amostra, preparo dos reagentes conjugados que precisam ser previamente testados.
Semeadura em meios sólidos	Realização de ensaios de microbiologia.	Domínio de técnicas microbiológicas.	Capacidade de concentração, organização e habilidade manual e de reproduzir instruções e receber orientações.	Abertura de criotubo, preparo do pré-inóculo, preparo do inóculo, biorreção (cinética), atividades finalísticas de término da biorreção	Para semeadura: 15 min. Incubação: 48 h. Leitura: 15 min. Conforme implementação da produção.
Medida da densidade óptica	Ensaio físico-químico.	Domínio de técnicas em microbiologia, conhecimentos de espectrofotometria.	Capacidade de concentração, organização e habilidade manual, e de reproduzir instruções e receber orientações.	Abertura de criotubo, preparo do pré-inóculo, preparo do inóculo, biorreção (cinética), atividades finalísticas de término da biorreção	Conforme implementação da produção.

4.4.3 Critério 5.3 – Acomodações e condições ambientais (instalações)

As instalações ou áreas de processo também têm relevância na qualidade do produto. As condições ambientais devem obedecer às regras e normas exigidas para a manufatura de injetáveis, uma vez que esta é a forma de apresentação do produto em estudo. Se as instalações laboratoriais forem contíguas, porém fora das áreas classificadas, o rigor ambiental é menor.

A tecnologia do DNA recombinante baseia-se no uso de vetores de expressão obtidos por meio da modificação genética de um microrganismo. A legislação vigente no país, que deve ser adotada para manipulação de organismos geneticamente modificados (OGM), é a Lei n. 11.105 (2005). Para manipulação dos OGM, faz-se necessária a obtenção e certificado junto a CTN Bio, órgão responsável pela verificação do cumprimento de tais normas. Os produtos obtidos por esta tecnologia, especialmente peptídeos e proteínas, possuem sua estrutura química definida e não têm nenhum resíduo de material genético, portanto não são considerados derivados de OGM (Nota Técnica 05/2007, 2007).

As normas para garantir as boas práticas de fabricação são encontradas na RDC 210 (2003), cujos requisitos mínimos para instalações estão descritos no seu item 11 e os critérios específicos para instalações de produção de injetáveis estão descritos no item 17 (Anvisa, 2003).

Para a atividade de fermentação, quando são manipulados microrganismos vivos, as operações de controle em processos devem transcorrer na própria área de fermentação e ser realizada por técnico capacitado para realização desta atividade e vinculado ao controle em processo. Este profissional deverá realizar as atividades na área e retirar-se ao seu término. Sugere-se também que esta rotina sofra rodízio de pessoal para que toda equipe esteja apta a realizar os ensaios. Os equipamentos direcionados ao cumprimento desta prática devem ser mantidos na área de fermentação, pois há a necessidade de contenção do ambiente devido à manipulação de microrganismos geneticamente modificados.

As amostras, previamente inativadas, são direcionadas para o laboratório de controle em processo, para realização de dosagens físico-químicas.

As tubulações fixas destinadas à condução de fluidos ou gases devem ser devidamente identificadas conforme legislação vigente e a direção do fluxo deve ser indicada, bem como as tubulações que servem aos equipamentos. A água purificada

com aplicação em técnicas cromatográficas em geral é a mesma utilizada nos processos de produção e está prevista nas instalações sanitárias do laboratório.

O laboratório está instalado no prédio de produção e possui área classificada grau D, com insuflamento de ar e temperatura controlada. O monitoramento ocorrerá manualmente através da verificação diária.

A rede elétrica e pontos de uso foram dimensionados de acordo com o montante de equipamentos destinados à área e compatível com as necessidades, definidas nos manuais dos equipamentos e a partir das informações dos fornecedores da tecnologia.

Sistemas de alarmes, estabilizadores de voltagem e gerador atendem aos equipamentos críticos nos quais a queda de energia possa incorrer em perda do estudo ou até danos ao equipamento analítico.

Não há restrições para a realização dos ensaios. Determinações microbiológicas, por exemplo, carga microbiana e pureza do cultivo são desenvolvidas em cabina de segurança biológica nas áreas de processo, separada daquela destinada aos ensaios químicos. Os testes de controle da biorreação são realizados na área de contenção, junto à produção, como controle de pureza microbiana. As instalações do laboratório analítico são destinadas a análises físico-químicas. Somente a incubação dos testes ocorre nas instalações do laboratório de controle em processo. O acesso a esta área foi projetado com senha de acesso e somente os funcionários e interfaces específicas podem adentrá-la.

Deve ser estabelecida sistemática destinada ao acesso de materiais, insumos e pessoal no laboratório de controle em processo, considerando-se os aspectos apresentados relativos a biossegurança.

4.4.4 Critério 5.4 – Métodos de ensaio e validação de métodos

As validações analíticas, calibração dos instrumentos de medição, qualificação de equipamentos analíticos são realizados com apoio do Lamev/Sevan (Laboratório de Metrologia e Validação/ Setor de Validações Analíticas). A interface com esta unidade organizacional deve ser ampla de maneira a permitir que os métodos analíticos propostos, bem como os equipamentos e instrumentos utilizados nas determinações sejam avaliados de acordo com a utilização e impacto no processo. Da mesma forma, a interface entre o controle em processo e o controle da qualidade deve ser grande. Os ensaios realizados nos produtos intermediários e

finais são semelhantes às técnicas analíticas desenvolvidas ao longo do processo produtivo pelo controle em processo, de forma que avaliações interlaboratoriais podem ser usadas, bem como procedimentos analíticos.

As incertezas relativas aos instrumentos de medição serão estimadas nos relatórios de calibração de cada item, assim como as incertezas referentes aos métodos de análise que devem estar disponíveis nos relatórios de validações. Estes parâmetros devem ser utilizados para o cálculo de incerteza de medição. O Sevan publicou o procedimento DI 1132 – Estimativa de Incerteza de Resultados de Análises. É necessário que se estabeleça treinamento e aplicação deste procedimento nas áreas no laboratório de controle em processo.

Os métodos analíticos propostos pelo parceiro tecnológico encontram-se publicados e foram validados. Uma nova validação da metodologia precisa ser estabelecida com o Lamev/Sevan, quando do arranque da planta e da produção dos três lotes de consistência.

Novos métodos de ensaio precisam ser previamente aprovados pela Garantia da Qualidade e pelo parceiro tecnológico a partir da sistemática estabelecida em Bio-Manguinhos de Solicitação de Mudança. A solicitação de mudança é uma ferramenta disponível na intranet. Após o registro, são avaliados os impactos no processo e as principais orientações para a mudança. O DI 007 – Solicitação de Mudança estabelece a sistemática para implantação de mudanças, bem como avalia o grau de impacto do processo produtivo.

Os parâmetros que devem ser avaliados dependem da categoria à qual o método pertence. Estão relacionados na tabela 4.5 os parâmetros para as metodologias analíticas do controle em processo do IFN alfa 2b hu-r.

Tabela 4.5– Parâmetros mínimos necessários para avaliação das metodologias analíticas destinadas ao controle em processo do IFN alfa 2b hur

Ensaio	Categoria	Parâmetro	Protocolo
Pureza do cultivo: Semeadura em ágar	IV	Especificidade	Avaliação de crescimento utilizando meios de cultivo e cepas padrão
Observação ao microscópio óptico (coloração de Gram)		Especificidade	Avaliação da morfologia de cultivos de cepas padrão coradas pelo método de Gram
Esterilidade do meio de cultivo		Especificidade	Avaliação do ensaio frente desafio com cepas padrão
Estabilidade plasmidial		Especificidade	Avaliação frente a cultivos de cepas padrão em meios de cultura com e sem antibióticos
Densidade óptica do cultivo (taxa de crescimento específico)	I	Especificidade	Protocolo exige pelo menos 3 lotes com amostras contendo alto, médio e baixo teores do analito. Para exatidão, padrão ou substância com conteúdo conhecido para cálculo de recuperação.
Consumo de substrato durante a fermentação		Linearidade	
Determinação de proteínas totais		Intervalo	
Teor de IFN alfa 2b Hur por Clae ^{***} Técnica de Fase reversa		Repetitividade	
Teor de IFN alfa 2b Hur por Elisa		Precisão intermediária *	
Teor de endotoxinas <i>in vitro</i>	Exatidão		
Pureza do IFN alfa 2bHur SDS-Page	II	Robustez	Além dos testes exigidos para categoria I, ainda é necessária a avaliação do limite de quantificação.
Pureza do IFN alfa 2bHur Eletroforese		Especificidade	
Formação de produto Western Blot		Linearidade	
		Intervalo	
		Repetitividade	
		Precisão intermediária **	
		Limite de quantificação	
		Exatidão	
		Robustez	

* pode ser necessário dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária comprovação da precisão intermediária.

*** Clae: Cromatografia líquida de alta eficiência.

Fonte: Adaptado RE 899, 2003.

4.4.5 Critério 4.5 – Equipamentos

Ao tratarmos da confiabilidade de medição analítica, percebemos que alguns fatores contribuem para a variabilidade dos resultados. Um dos fatores relaciona-se aos recursos humanos, ao meio ambiente em que o ensaio é realizado e também os equipamentos.

Equipamentos destinados a quimiometria são denominados ‘instrumentos de medição’. São vidrarias, micropipetas e espectrofotômetros, balanças analíticas, termômetros, higrômetros, etc. Já outros equipamentos permitem o processamento e preparo de amostras para a medida. Dentre eles, ressaltamos os concentradores a vácuo, liofilizadores de bancada, cromatógrafos, banhos-maria, blocos aquecedores, aparato para eletroforese de proteínas, os quais também precisam sofrer avaliações periódicas. Estes equipamentos estão sujeitos a qualificações de instalação, operação e desempenho.

Para garantir que os equipamentos passem por avaliações periódicas, o laboratório estabelece um plano de calibração e qualificação, bem como um plano de manutenções preventivas.

Realizam-se as manutenções preventivas na intenção de diminuir paradas nas análises devido à falha dos equipamentos – seria a manutenção corretiva. As manutenções preventivas dependem da natureza dos equipamentos e são definidas de forma a não atrapalhar o processo produtivo do laboratório.

Conforme a frequência do número de intervenções sofridas estima-se a necessidade de manutenções preventivas para cada equipamento.

Atualmente, no laboratório de controle em processos para produção de vacina contra Hib, todas as informações estão disponibilizadas no preenchimento do *Log Book*. Todos os funcionários recebem treinamento no procedimento DI 1873, estabelecido pelo Degaq /Dibop (Divisão de Boas Práticas).

Há planejamento previamente estabelecido para manutenção preventiva dos equipamentos através do Plano Mestre de Validação (PMV), e os instrumentos de medição são avaliados durante a sua calibração, quando são realizados ajustes. Os planejamentos são construídos por meio da interface Lamev com a Divisão de Manutenção (Diman). Aqueles equipamentos cuja calibração ou qualificação está vencida são prontamente identificados e retirados de uso.

São disponibilizados pelo Lamev/Secal padrões para verificação intermediária de balanças. O procedimento DI 0304 estabelece tal sistemática. Os espectrofotômetros possuem um conjunto de padrões disponíveis no laboratório e seguem a sistemática interna de verificação. Periodicamente, os padrões são calibrados. Já as micropipetas são verificadas ao retornarem do serviço de calibração pelos usuários.

O controle em processo registra ações de verificação de espectrofotômetros e micropipetas, embora não haja procedimentos formais estabelecidos.

Pelo exposto, há evidências de que existe grande interface entre Lamev e controle em processo para os equipamentos e principalmente para os instrumentos de medição. A responsabilidade, neste caso, é dividida, e a comunicação interna precisa ser bem conduzida para o sucesso da atividade.

Seguem-se os procedimentos que deverão ser observados no novo laboratório de controle em processo:

- Treinamento do grupo para implantação DI 1873 – Preenchimento de *log books*.
- Execução de planejamento conforme criticidade de equipamentos e instrumentos. Interface entre Controle em Processo/Lamev/Diman.
- Treinamento no DI 0304 – Verificação intermediária de balanças.
- Estabelecer a sistemática formalizada junto à Degaq/Dibop para verificação intermediária de instrumentos de medição e equipamentos analíticos.
- Elencar os equipamentos necessários para atendimento à demanda, ou em casos especiais subcontratar serviço.
- Estabelecer formalmente um plano de manutenção, calibração e qualificação.

4.4.6 Critério 5.6 – Rastreabilidade

Atualmente, o Lamev dispõe de seções como a de Calibração Secal, acreditados pelo Inmetro, segundo critérios da norma NBR:ISO/IEC 17025. A interface do controle em processo com esta seção inclui a calibração de vidrarias, micropipetas, balanças analíticas, termômetros, higrômetros.

Outros equipamentos de processo são qualificados, como geladeiras, freezers, estufas por técnicos da seção de equipamentos térmicos, porém um termômetro é mantido dentro das câmaras para acompanhamento da temperatura ao longo do período.

Os cromatógrafos líquidos são periodicamente avaliados, através da manutenção preventiva, quando são substituídas peças que sofrem desgaste ao longo do período de uso, bem como qualificação de desempenho, através de contratos preestabelecidos entre a assistência técnica do fabricante. O técnico da seção de validação analítica acompanha o serviço de qualificação.

Os aparatos para eletroforese de proteínas também necessitam de avaliação e qualificação prévias ao seu uso.

Quanto aos materiais de referência utilizados para validação de ensaios, não há procedimento formalmente estabelecido. No caso da transferência de tecnologia para a produção da vacina contra Hib, houve o repasse das informações referentes ao preparo de material de referência para validação dos ensaios físico-químicos e sua utilização como controle da qualidade.

Padrões comerciais quando adquiridos precisam ser certificados e aptos à rastreabilidade.

O parceiro tecnológico para a produção de IFN alfa 2b hu-r possui uma sistemática padronizada. O processo de transferência de tecnologia prevê o repasse deste procedimento para incorporação em Bio-Manguinhos. A padronização deste procedimento é necessária a fim de validar os ensaios e verificar os desvios que possam ocorrer durante a rotina laboratorial.

4.4.7 Critérios 5.7 e 5.8 – Amostragem e manuseio de amostras

Os critérios 5.7 e 5.8 referem-se à amostragem e manuseio de amostras e serão tratados em conjunto, por se referirem a uma mesma ação.

É preciso realizar a amostragem que represente estatisticamente o lote em análise e para isto é necessário seguir procedimentos formalmente estabelecidos.

As amostragens realizadas no controle em processo são retiradas de um lote a granel. Para certificar-se de que o todo está representado, é necessário evitar tendências.

As amostragens não tendenciosas são aquelas em que todos os elementos da inspeção têm a mesma probabilidade de serem incluídos na amostra (Triola, 1998).

Os planos de amostragem podem seguir as recomendações das agências regulatórias nacionais ou internacionais, porém precisam garantir que as amostras representem o todo e sejam mantidas em condições ambientais para que não sofram degradação, a ponto de alterar a composição da amostra. A homogeneidade também pode contribuir com a incerteza de medição (RDC n. 210, 2003).

Na produção de vacina contra Hib, as amostragens destinadas ao controle em processo são realizadas pela produção e encaminhadas ao laboratório de controle em processo. O quantitativo de amostra é recolhido em função dos procedimentos encaminhados pelo parceiro tecnológico. Os registros referentes à ação estão inseridos nos protocolos de produção e as amostras são acondicionadas em frascos

identificados com o tipo de amostra, procedência, número de lote, data, ensaios solicitados. As amostras de arquivo são registradas da mesma maneira e são retidas pelo período de validade acrescido de mais dois períodos iguais.

Registra-se a entrada da amostra no laboratório. O número sequencial deve estar de acordo com o registro da amostra. Os ensaios necessários a cada etapa do processo estão formalmente definidos em procedimentos relativos à produção. O memorial descritivo e o fluxograma de processo também são documentos da qualidade que estabelecem a quantidade de amostra e os ensaios relativos a cada uma delas.

Algumas ações propostas devem ser estabelecidas antes do início das atividades do novo laboratório. São elas:

- Avaliar os métodos estatísticos preconizados para amostragem junto ao parceiro tecnológico.
- Incluir os registros de amostragem aos protocolos de produção além de referenciar o método estatístico para amostragem.
- Estabelecer sistemática para identificação e encaminhamento das amostras para cada etapa do processo de produção.

4.4.8 Critério 5.9 – Garantia da qualidade de resultados de ensaios

Em geral, utilizam-se três réplicas para execução dos ensaios. Tais réplicas têm o intuito de avaliar as diferenças entre as medidas, incluindo-se um padrão de referência estabelecido, avaliando-se a diferença entre o valor verdadeiro convencional e o resultado obtido para uma mesma corrida ou determinação analítica. No caso de produção em batelada, é bastante útil a avaliação lote a lote dos resultados obtidos a fim de se verificar tendências e estabelecer limites de controle, ou seja, aplicação do controle estatístico de processo.

Propõe-se a construção de cartas de controle estatístico de processo. O objetivo principal do controle estatístico de processo é monitorar as variáveis de interesse, e criar assim a possibilidade de atuar de forma corretiva no processo de produção (Alencar *et al.*, 2007). Esta atuação se dá de maneira proativa durante a produção, minimizando os riscos de reprovação do produto final. As cartas de controle ou controle estatístico de processo, ou cartas de Shewart são construídas e estabelecidas a partir dos resultados, variáveis, obtidos lote a lote. Os lotes

produzidos são submetidos aos limites de controle calculados. Os limites não sofrem alteração se não houver mudanças significativas durante a produção. O modelo apresentado por Shewart utiliza a média aritmética dos valores resultantes das medições realizadas de forma amostral, como medida de posição de processo. Estabelece três desvios acrescidos à média, limite superior de controle e três desvios diminuídos da média, ou limite inferior de controle (Lima et al. 2006).

São encontrados no mercado *softwares* destinados ao controle estatístico de processo. A capacitação do corpo técnico para sua utilização, bem como em estatística, é imprescindível para estabelecer o processo.

As cartas de controle permitem a visualização de pontos fora de controle, bem como se existem tendências ou não em avaliações lote a lote. Qualquer desvio precisa ser investigado com a finalidade de se apurar as causas, seguidas de tomadas de ações que eliminem definitivamente tais causas de não-conformidades. As investigações são conduzidas por meio dos dados registrados, como matérias-primas utilizadas, equipamentos em uso, operadores, de forma que as causas e consequências sejam analisadas. As mudanças propostas precisam ser discutidas e analisadas com envolvimento do gerente da qualidade, gerente técnico do laboratório e gerente responsável pela produção e seus supervisores da área.

Limites de Controle para o Gráfico das Medidas Individuais	
$LSC_x = \bar{\bar{x}} + 3 \cdot \frac{\overline{MR}}{d_2}$	(1)
$LM_x = \bar{\bar{x}}$	(2)
$LIC_x = \bar{\bar{x}} - 3 \cdot \frac{\overline{MR}}{d_2}$	(3)
Limites de Controle para o Gráfico da Amplitude Móvel	
$LIC_{MR} = D_3 \cdot \overline{MR}$	(4)
$LM_{MR} = \overline{MR}$	(5)
$LSC_{MR} = D_4 \cdot \overline{MR}$	(6)
<p>onde $\bar{\bar{x}}$ é a média dos pontos do gráfico para cada variável e $MR_i = x_i - x_{i-1}$, isto é, a diferença entre dois valores subsequentes de cada variável, \overline{MR} as médias das amplitudes, e os parâmetros c_4, B_3 e B_4 por d_2, D_3 e D_4 são tabulados (Montgomery, 2001).</p>	

Figura 4.4 – Fórmulas para cálculo dos limites de controle superior e inferior.

Fonte: Alencar et al. 2007.

Os ensaios interlaboratoriais ou de proficiência são recomendados como método de excelência para demonstrar a confiabilidade dos resultados ou grau e assertividade do laboratório.

Atualmente, os padrões ou referências utilizadas e que são preparadas pelo fabricante precisam ser avaliados previamente ao uso, por intermédio de materiais de referência cuja procedência possa ser identificada. Os padrões primários necessitam de rastreabilidade e, portanto, necessitam de certificação.

O controle em processo nos dias de hoje não participa de programa interlaboratorial. Há proposta ainda não formalizada para a criação de um programa entre Lafiq e DICPR.

A correlação dos resultados deve ser conduzida e a implantação de CEP possibilita a visualização das variações intralote, bem como tendências e pontos fora de controle.

O grau de acerto relativo aos materiais de referência é utilizado para aceitar ou rejeitar os ensaios.

Alguns pontos deste tópico encontram-se aqui ressaltados:

- Implantar a sistemática para construção de cartas de controle (CEP), na medida que os lotes sejam produzidos. Solicitar ao parceiro tecnológico algumas cartas de controle como referência, embora os limites estabelecidos

para o parceiro tecnológico não possam ser utilizados em Bio-Manguinhos devido às diferenças entre desempenho de equipamentos, operadores e insumos.

- Estabelecer uma sistemática junto ao parceiro tecnológico para padronizar material de referência secundário.
- Implantar ensaios interlaboratoriais, junto ao departamento de controle da qualidade.
- Adotar réplicas na condução das determinações analíticas.

4.4.9 Critério 5.10 – Apresentação de resultados

Os critérios do procedimento GGLAS 02/17025 estabelecem uma série de requisitos para expressão dos resultados, porém trata-se de requisitos destinados aos laboratórios prestadores de serviços externos. Não se aplica na íntegra ao controle em processo, cujo cliente é o produtor. Entretanto, algumas recomendações são bastante coerentes e podem ser padronizadas para os demais laboratórios de controle em processo da unidade.

Atualmente, o controle em processo destinado à produção de vacina contra Hib fornece um boletim de análise, em que o conteúdo atende aos critérios preconizados pela RDC 210 (2003), quando se determina que os dados gerados no laboratório de controle em processo devem compor o dossiê do produto. Incluem-se dados brutos, planilhas de cálculo, métodos, operadores, devidamente reconciliados pelo supervisor da área, controle em processo, bem como pelo Degaq.

Os relatórios de ensaio ou boletins de análise destinados ao laboratório de controle em processos do INF alfa 2b hu-r podem seguir o mesmo modelo proposto para a vacina contra Hib, no entanto, alguns itens requeridos pelo procedimento GGLAS 02/17025 não estão presentes no modelo atualmente padronizado. Elaborou-se uma proposta para o modelo de relatório de ensaios, conforme a seguir.

O título e nome do cliente devem ser colocados no cabeçalho do documento, incluindo-se a etapa do processo ao qual se referem. O número da página e o número de páginas do documento, além do título do documento, permitem reconhecer as partes integrantes do boletim de análise. À medida que as análises são efetuadas, o Boletim de análise é preenchido.

As metodologias estão referenciadas no corpo do boletim de análise. Uma melhoria proposta é de ser registrado também o DI relacionado com a atividade.

Cada amostra recebe um registro que é transcrito ao boletim de análise. Este registro deve ser realizado no intuito de rastrear a amostra, caso seja necessário, como as datas de recebimento e realização do ensaio.

Padronizar e formalizar o plano de amostragem para o controle em processo, junto ao controle e garantia da qualidade.

Os resultados devem ser expressos de acordo com suas unidades de medida, além de prever um campo para expressão da incerteza de medição.

O supervisor do controle em processo, ou seja, o gerente técnico, deve assinar todos os boletins de análise, após a verificação e avaliação crítica dos resultados.

É necessário prever um campo para observações de desvios que sejam evidenciados nas análises. Além do relato registrado, é necessária a comunicação imediata ao cliente, e deve também ser registrada com a data e o meio de comunicação. Esta é uma das responsabilidades do controle em processo. Tais desvios são registrados nos boletins de análise, bem como as ações tomadas pela produção, nos registros relativos à produção pelo supervisor da área.

Deve ser destinado um campo para se relacionar a conformidade ou não-conformidade de cada ensaio.

Deve ser prevista a determinação escrita com a proibição de reprodução do documento.

Os dados de amostragem devem ser registrados pelo operador que a realizou. No caso do controle em processo, as amostragens são efetuadas pelos operadores da produção. Portanto, a informação deverá constar dos requisitos da produção e não no relatório de ensaios. O plano de amostragem, uma vez estabelecido, somente sofrerá alterações em função de uma ação corretiva ou melhoria. Em caso de mudanças, deve-se gerar um registro e todos os envolvidos tomam conhecimento por ocasião de reuniões de análise crítica.

A divulgação dos resultados, com a finalidade de agilizar as ações da produção, também é feita através de meio eletrônico, em planilhas padronizadas às quais as partes interessadas têm acesso somente para leitura. Apenas o corpo técnico do controle em processo possui permissão para realizar alterações. O sistema permite a rastreabilidade de alterações.

Quando é necessário reteste, indica-se registrar a ação com a observação de que se trata de uma reanálise, pois o ensaio anterior apresentou desvios.

Todas as observações inerentes aos procedimentos de ensaio e equipamentos são justificadas no boletim de ensaio, e o cliente tem acesso ao documento, que contém além dos resultados todos os dados brutos gerados, cálculos, cromatogramas e registros.

Os pareceres e opiniões quando pertinentes são destacados no próprio boletim de análise, para que providências sejam tomadas. As tomadas de ações são conjuntas entre produção e garantia da qualidade, representadas por meio do Pinte.

Não são realizadas subcontratações, uma vez que o laboratório de controle em processo é estruturado a fim de atender à demanda da produção, porém, se houver necessidade, é preciso informar ao cliente e justificar tal ação.

A implantação dos boletins de análise para o controle em processo do IFN alfa 2b hu-r poderá ser controlada por meio de um livro de registros de amostras, no qual o técnico assina a entrega da amostra e o recebimento dos resultados. Há controle da data e hora de recebimento e entrega a fim de avaliar a eficácia do sistema. A padronização dos dados por meio eletrônico deve ser de fácil acesso, porém precauções devem ser tomadas quanto à modificação dos arquivos. A disponibilização deve ser feita apenas para leitura dos solicitantes/usuários. As tabelas 4.6 e 4.7 apresentadas a seguir resumem as propostas elencadas no trabalho para o modelo de gestão proposto. Este resumo permite visualizar as ações necessárias para implantação de um modelo com base em práticas que buscam alta confiabilidade metrológica, rastreabilidade dos dados obtidos e referências e padrões adotados, permitindo que qualquer dado gerado em que a qualidade do produto possa ser questionada possa ser apurado, e permita avaliar a confiabilidade dos resultados gerados a partir dos ensaios. Com estabelecimento de cartas de controle podem-se ser criticamente avaliadas as causas de tendências no processo de produção e suas prováveis causas.

Tabela 4.6 – Resumo das propostas dos requisitos gerenciais estabelecidos no Procedimento GGLAS 02/17025 (2001)

Item	Requisitos gerenciais	Propostas
1	Organização	Designar gerente técnico (supervisor do laboratório de controle em processo), gerente da qualidade com as respectivas atribuições.
2	Sistema da Qualidade	Estabelecer Manual da Qualidade com a política da qualidade para o laboratório, objetivos, estrutura da documentação que compõe o sistema da qualidade para o laboratório de controle em processo e o organograma (institucional).
3	Controle de documentos	Implantação e treinamento DI 001 – Controle de documentos internos, do SGQ BM.
4	Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos	Análise crítica dos cronogramas de produção, envolvendo a gerência do departamento. Planejamento de materiais e insumos para consecução da proposta. Qualquer mudança na produção ou análise que requeira revisão no planejamento e quantitativo de amostras deve ser discutida previamente. Implantação do DI 007 do SGQ BM – Controle de mudanças.
5	Subcontratação de ensaios e calibração	Implantar o DI 011 – Análise crítica dos pedidos, propostas e contratos analisados pelo Secal. Remeter a tomada de decisões no âmbito do instrumento de análise crítica pela alta administração (por alta administração entende-se gerente do departamento/laboratórios ou divisões/seções envolvidos com a produção e controle da qualidade).
6	Aquisição	Adoção e implantação dos documentos DI 0013 – Aquisição de serviços e materiais e DI 0481 – Controle de validade dos materiais classes A e B pertencentes ao SGQ-BM.
7	Atendimento ao cliente	Implantar o DI 0016 – Grau de satisfação dos clientes. Criar mecanismos para retorno do cliente pelos serviços prestados. Registrar e documentar. Levar à discussão em reuniões de análise crítica pela alta administração.
8	Reclamações	Estabelecer sistemática para registro de reclamação. Criar a ferramenta que facilite o registro, como planilha ou tabela que possa ser alimentada a partir de reclamações recebidas via correio eletrônico, ou verbalmente. Todas devem ser levadas para reunião de análise crítica pela alta administração.
9	Controle de trabalho não-conforme	Tratamento de não-conformidades, proposta de ação corretiva e preventiva – oportunidade de melhoria.
10	Ação corretiva	Implantar DI 002 – Abertura de relatório de melhorias e não-conformidades, investigação e tomada de ações preventivas e corretivas. Todas as não-conformidades e tomadas de ação devem ser expostas e discutidas em reuniões de análise crítica com a alta administração.
11	Ação preventiva	
12	Controle de registros	Implantar o DI 003 – Controle de registros SGQ-BM.
13	Auditorias internas	Preparar o grupo de auditores internos quanto aos critérios estabelecidos no Proc. GGLAS 02/17025 (2001). Estabelecer a sistemática para auditorias – SGQ BM.
14	Análise crítica pela alta gerência	Estabelecer a sistemática incluindo-se os participantes obrigatórios, frequência de reuniões, responsabilidades, autoridade para tomada de decisão.

Tabela 4.7 – Resumo das propostas para requisitos técnicos estabelecidos no Procedimento GGLAS 02/17025 (2001)

Item	Requisitos Técnicos	Propostas
2	Pessoal	Estabelecer perfis para composição do corpo técnico. Adotar como modelo DI 0019 SGQ-BM Programa de treinamento para Secal. Elencar as necessidades de treinamento e capacitação para o corpo técnico.
3	Instalações	Estabelecer sistemática para entrada de pessoal e materiais, bem como recebimento de amostras nas instalações do laboratório. Adotar sistemática de troca de roupa para adentrar as instalações de produção. Implantar as normas de Biossegurança conforme estabelecido na Lei 11.105 (2005).
4	Métodos e Validação de métodos	Interface entre Dequa/Lamev para padronização dos procedimentos analíticos, alinhando-os àqueles utilizados pelo Dequa. Propor validações analíticas e qualificações/calibrações de instrumentos de medição, a fim de implantar cálculos para incerteza de medição. Implantação de técnicas e ferramentas estatísticas para expressão dos resultados. Seguir recomendações da RE 899 (2003).
5	Equipamentos	Planejar manutenções preventivas, prevendo em contrato de manutenção vistas para corretivas. Implantar o DI 1873 – Preenchimento de Log Book. Estreitar a interface entre Dimam/Lame e controle em processo. Estabelecer plano de calibração de instrumentos de medição e qualificação de equipamentos analíticos.
6	Rastreabilidade	Padrões, materiais de referência certificados precisam ser rastreáveis e possuir certificado que ateste sua qualidade. Estabelecer sistemática para o preparo de materiais de referência. Interface entre Dequa/Lamev/Controle em processo.
7	Amostragem	Interface Dequa/Controle em processo, para estabelecer plano de amostragem.
8	Manuseio de amostras	Procedimentos de amostragem e seus quantitativos devem ser estabelecidos e formalmente estabelecidos. Manutenção de amostras de retenção, definidos os tempos de guarda e disposição. Estabelecer sistemática para dinâmica de funcionamento do laboratório de controle em processo, com relação ao recebimento das amostras, realização dos ensaios, tratamento dos dados brutos e disponibilização dos resultados obtidos.
9	Garantia da Qualidade dos resultados	Implantação dos cálculos de incerteza de medição, cálculos de limite de confiança, controle estatístico de processo, validações analíticas, ensaios interlaboratoriais (Dequa/Lamev/ Controle em processo).
10	Apresentação dos resultados	Em reunião de análise crítica discutir a melhor maneira de dispor os resultados, garantindo a integridade dos arquivos eletrônicos ou entrega das cópias físicas.

4.5 Considerações finais

A partir da aplicação da metodologia HACCP destinada a análise de riscos nas etapas do processo produtivo do modelo em estudo INF alfa 2b hu r, estabeleceram-se os pontos críticos de controle. O processo produtivo foi desenhado com base em revisão de literatura. Já as premissas para a eleição dos PCC constam da TRS 908 (2007).

A cada ponto de controle ou monitoramento foram propostas metodologias analíticas já publicadas e disponibilizadas na literatura. A partir deste mapeamento foi possível elaborar uma proposta para gerenciamento e estruturação de um laboratório destinado ao controle em processo. Este modelo pode ser aplicado a outros produtos e processos, guardadas as devidas particularidades de cada um.

Um resumo da proposta tanto para critérios gerenciais, ou seja, aqueles que tratam da organização do laboratório, quanto para requisitos técnicos foi disponibilizado nas tabelas 4.6 e 4.7. É importante ressaltar que as necessidades requisitadas segundo norma de excelência para um laboratório analítico foram alinhadas aos procedimentos e práticas atualmente vigentes no Sistema de Gestão da Qualidade da organização.

5 CONCLUSÕES

O modelo proposto neste estudo é flexível e pode ser estendido a outros laboratórios com atividades semelhantes que atendam a outros processos ou produtos que venham a ser produzidos na unidade.

A metodologia de análise de riscos mostrou-se uma ferramenta eficiente para se estabelecer os pontos críticos de controle. Pode ser utilizada em outros processos para produto gerado na unidade, tanto para se estabelecer os PCC como para uma análise de riscos mais aprofundada, levando em consideração as demais etapas de produção até o processamento final do produto. Para o estudo destinado ao biofármaco INF alfa 2b hu-r, foi possível verificar, ponto a ponto, no fluxograma de processo, quais os controles necessários durante a produção do produto.

Os laboratórios analíticos de controle em processo precisam ser dinâmicos e proativos, portanto, é necessário utilizar as ferramentas de CEP e, conseqüentemente, diagramas de causa e efeito com o intuito de auxiliar a produção na tomada de decisões.

O modelo gerencial levou em consideração as diretrizes já adotadas na unidade com base no sistema da qualidade vigente, que é pautado nos critérios de boas práticas de fabricação. A adoção de tais procedimentos vem reforçar o sistema da qualidade já implantado. Foram propostas algumas ações que vão complementar as diretrizes já estabelecidas em Bio-Manguinhos, de acordo com as exigências do procedimento GGLAS 02/17025. A garantia da qualidade das medições é assegurada a partir do atendimento aos requisitos técnicos e, para tanto, precisam ser adotados para o laboratório analítico de controle em processo.

5.1 Perspectivas futuras

Este estudo terá alguns desdobramentos futuros, pois o processo de produção da proteína recombinante INF alfa 2b hu-r ainda não está totalmente nacionalizado. A partir da implementação das etapas de produção do ingrediente farmacêutico ativo, será necessário estabelecer os limites de aceitação para os pontos críticos de controle (PCC), por meio da confecção das cartas de controle.

A adoção deste modelo para o laboratório de controle em processo destina-se à vacina Hib.

Os laboratórios analíticos necessitam adotar os programas interlaboratoriais ou desenvolver programas interlaboratoriais em conjunto, a fim de evidenciar seu desempenho, de modo a promover ações corretivas sistematicamente para garantir a confiabilidade dos resultados.

Outra ação necessária é a de padronizar a sistemática para a confecção de materiais de referência para unidade. Desta forma será possível avaliar a exatidão dos ensaios, aumentando o grau de confiabilidade das dosagens analíticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Saunders, 6th. Ed. Philadelphia, 2007.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência Geral de Laboratórios Analíticos em Saúde, Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde. **Procedimento GGLAS 02/17025 Critérios para habilitação de laboratórios analíticos em saúde segundo os princípios da ISO/IEC 17025**. Brasília: Anvisa, 2001.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Laboratórios Analíticos em Saúde, Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde. **Seleção uso e interpretação de programas de ensaios de proficiência (EP) por laboratórios**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2009 [capturado em 13 de fevereiro de 2009] Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos.htm>.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR: ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2005. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR:ISO/IEC GUIA 43, Ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais – parte 1: desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência**, 1999, Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005.

Alencar, JRB, Lopes, CE e Souza Jr. MB. **Monitoramento do processo de compressão de comprimidos de captopril utilizando controle estatístico de processo**. Rev Bras Farm 2007; 88 (2): 89-97.

Alter, MJ. **Epidemiology of hepatitis C virus infection**. World J Gastroenterol 2007;13(17). 2436-2441.

Altria, KD, Kelly, MA, Clarck, BJ. **Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electroforesis**. TrAC 1998; 17 (4): 204-214.

Azevedo, N, Gadelha, CAG, Ponte, CF, Trindade, C, Hamilton, W. (organizadores). Inovação em Saúde. **Dilemas e desafios de uma instituição pública**. Fiorcuz, 2007.

Babu, RK, Swaminathan, S, Marten, S, Khana, N, Rinas, U. **Production of interferon α in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins.** Appl Microbiol Biotechnol 2000; 53: 655-660.

Benedetti, ALM de L. Avaliação das incertezas de medições analíticas em implementação de um modelo de controle. [dissertação]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2005.

Betersfield, DH. **Quality control.** Prentice Hall 1986; New Jersey

Bio-Manguinhos. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2009. [capturado em 13 de fevereiro de 2009]. Disponível em <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe.sys/start.htm?sid=156>.

Brandão, HP, Guimarães, TA. **Gestão de competências e gestão de desempenho: tecnologias distintas ou instrumento de um mesmo construto.** RAE 2001; 41, (1): 1-15.

Brasil, Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica de Biossegurança. **Lei n. 11.105**, 2005. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

Brasil, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Nota técnica n. 05/2007**, 2007. Brasília: Diário Oficial da União, 2007.

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 210**, 2003. Brasília: Diário Oficial da União; 2003.

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE N. 899**, 2003. Brasília: Diário Oficial da União; 2003.

Benedetti, RCE. **Contribuição dos Sistemas da qualidade: proposta de modelo de gestão da qualidade para Bio-Manguinhos/Fiocruz.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008.

Brígido, MM. **Western blot.** In: Azevedo, MO, Felipe, MSS, Brígido, MM, Maranhão, AQ, De-Souza, MT. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular.** Organizadores. Brasília,: Editora UnB; 2003. p. 187-8.

Brito, NM, Amarante Jr. OP, Polese, L, Ribeiro, ML. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão.** Pesticidas R Ecotoxicolo e Meio Ambiente 2003; 13: 129-146.

Carelli, AC. Hazard Analisis and Critical Control Points (HACCP). [slides]. Rio de Janeiro: Grupo de produção integrada politécnica e Coppe/UFRJ, 2008.

Campos VF. **TQC: Controle da Qualidade Total (no estilo japonês)**. Belo Horizonte: Bloch; 1992.

Chevaliez, S, Pawlotsky, JM. **Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy**. World J Gastroenterol 2007; 13 (17): 2461-2466.

Eitman, MA, e Altman, E. **Overcoming acetate in *Escherichia coli* protein fermentations**. TIBTECH 2006; 24 (11):530-536.

Ettlin, U, Hochuli, E, Schacher, A, Weyer, K, inventores. Hoffmann-La Roche Inc., depositante. **Method for producing alpha interferon**. US Patent 6,005,075, Dec. 21, 1999.

Fleury, MTL, e Fleury, ACC. **Alinhando estratégia e competências**. RAE 2004; 44 (1): 44-57.

FNQ. **Conceitos fundamentais da Excelência em Gestão. Fundação Nacional da Qualidade**. São Paulo, 2006.

Garnick, RL, Solli, NJ, e Papa PA. **The role of quality control in Biotechnology: an analytical perspective**. Anal Chem 1996; 60: 2546-2557.

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

Harrison, M I & Shirom, A. **Organizational Diagnosis and Assessment**. Ed. Sage Publications, Inc. Thousand Oaks, California, 1999.

Hao, Y, Shi, Q, He, Y, Zhuang, Y, Wang, Y, Zhang, S, Chu, J, Liu, Z. **High expression of recombinant human consensus interferon $-\alpha$ by *Pichia pastoris***. Front Chem Eng China 2007; 1 (4): 399-403.

Hoerl, RW. **Discussion: controversies and contradictions in statistical process control**. J Qual Technol 2000; 32: 351-355.

Hokama, DA. **Avaliação das melhorias no sistema de Controle de Qualidade de vacinas em Bio-Manguinhos. Período 1999-2004**. [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular; 2004.

[HTTP://www.ccmrcornell.edu/facilities/contestimages/winnwers08Jam/Chem.html](http://www.ccmrcornell.edu/facilities/contestimages/winnwers08Jam/Chem.html).

Hund, E, Massart DL, Smeyers –Verbeke, J. **Operational definitions of uncertainty.** TrAC 2001; 20 (8): 394-404.

Isaacs, A, e Lindenmann, J. **Vírus interference.** Proc R Soc (Biol) 1957; 147: 258-267.

ISO 5725-1. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions.** 1994 (E).

Jungbauer, A, Kaar, W, Schlegl, R. **Folding and refolding of proteins in chromatographug beds.** Curr Opin Biotechnol 2004, 15: 487-494.

Khalilzadeh, R, Shojaosadati, SA, Maghsoudi, N, Mohammadian-Mosaabadi, J, Mohammadi, MR, Bahrami,A, Maleksabet, N, Nassiri-Khalilli, MA, Ebrahimi, M, Naderimanesh, H. **Process development for production of recombinant human interferon- γ expressed in *Escherichia coli*.** J Ind Microbiol Biotechnol 2004; 31: 63-69.

Kwon,S-C, Jung, S-Y, Choi, K-D, Kim C-S, Bae, S-M, Lee, G-S, inventores. Hammi Pharm. Co., Ltd., depositante. **Expression and secretion vector for human interferon alpha and process for producing human interferon alpha by employing same.** US Patent 7,052,867 B2; May 30, 2006.

Lima, AAN, Lima, JR, Silva, JL, Alencar, JRB, Soares-Sobrinho, JL, Lima, LG, Rolim-Neto, PJ. **Aplicação do controle estatístico de processo na indústria farmacêutica.** Rev Ciênc Farmac Bas Apl 2006; 27 (3): 177-187.

Lins, BFE. **Ferramentas Básicas da Qualidade.** Ciência da Informação 1993; 22 (2): 153-161.

Lowry, OH, *et al.* **Protein measurement with the folin-phenol reagent.** J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

MaCdownall, RD, Leavens, WJ, Massart, DL. **Merging laboratory information management systems and chemometrics: The pursuit of quality information.** Chemo Int Lab Sys 1992; 13 (3): 221-230.

Mackrides, SC, **Strategies for achieving high level expression of genes in *Escherichia coli*.** Microbiol Rev 1996; 60 (3): 512-538.

Market, W. **Novos paradigmas do conhecimento e modernos conceitos de produção:Implicações para uma nova didática na formação profissional.** Ed & Soc 2000; XXI (72): 177-196.

Marshall Jr. I, Cierco, AA, Rocha, AV, Leusin, S. **Gestão da Qualidade.** 8ª. Ed., Rio de Janeiro, 2006, FGV.

Ministério da Saúde. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2009. [capturado em 13 de fevereiro de 2009]. Disponível em http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/04_programa.pdf.

Mohammadian-Mosaabadi, J, Naderi-Manesh, H, Maghsoudi, N, Nassiri-Khalili, M-A, Masoumian, MR, Malek-Sabet, N. **Improving purification of recombinant human interferon γ expressed in *Escherichia coli*; effect of removal of impurity on the process yield.** Protein Expr Pur 2007; 51: 147-156.

Montgomery, DC. **Introduction to statistical quality control.** John Wiley & Sons s/ed. New York, 1985.

Olson, KC, inventor. Genentech Inc., depositante. **Purification and activity assurance of precipitated heterologous proteins.** U.S. Patent 4,518,526, May 21, 1985.

Osther, KB, Jensen WK, inventores. Ess-food Eksport – Svineslagteriernes Salgsforening, depositante. **Interferon Product and Process for its Preparation.** US Patent, 4,273,703. Jun. 16, 1981.

Palmigiani, ALM de L. **Avaliação das incertezas de medições analíticas em implementação de um modelo de controle.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2005.

Ribani, M, Bottoli, CBG, Collins, CH, Jardim, ICSF, Melo, LFC. **Validação em Métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quim Nova 2004; 27 (5): 771-780.

Ribeiro, JLD, ten Caten, CS, Fritsch, C. **Integrated process control.** International J Qual Rel Manag 2000; 18: 444-464.

Ruas, R, Antonello, C, Boff, LH. **Os Novos Horizontes da Gestão: aprendizagem organizacional e competências.** Porto Alegre: Bookman, 2005.

Ryan, TP. Statistical methods for quality improvement. 2nd. Ed. New York, 2000.

Samuel, EC. **Antiviral Actions of interferons.** Clin Microbiol Rev 2001: p.778-809.

Scapol, L, Marconi, S, Viscomi, GC, inventores. Alfa Wassermann S.p.A., depositante. **Process for the purification of pharmacologically active proteins through cationic exchange chromatography.** US Patent 6,866,782 B2; Mar.15, 2005.

Schmidt, FR, **Optimization an scale up of industrial fermentation processes.** Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 425 – 435.

Shiloach, J, Fass, R. **Growning E. coli to high cell density – A historical perspective on method development.** Biotech advanc 2005; 223: 345-357.

Shtrichman, R, e Samuel, CE. **The role of gamma interferon in antimicrobial immunity.** Curr Opin Microbiol 2001; 4: 251-259.

Silva Jr., JG. **Eletroforese de proteínas: Guia teórico-prático.** Rio de Janeiro, 2001; Editora Interciência.

Slack, N., Stuart, C, Johnston, R, autores. **Administração da Produção.** 2ª. ed. tradução por Maria Teresa Corrêa de Oliveira e Fábio Alher. São Paulo: Atlas; 2002. Tradução de Operations Management.

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

Sundström, H, **Analytical tools for monitoring and control fermentation processes.** RIT. Stockholm: 2007.

Taverniers, I, Van Bockstaele, E, De Loose, M. **Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results.** TrAC 2004; 23 (7): 480-490.

Tisminetzky, SG, Baralle, FE, inventores. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, depositante. **Process for the production of alpha interferon of therapeutical degree.** EP 1 310 559 A1. 14.05.2003.

Trinchet, JC, Ganne-Carrié, N, Nathon, P, N´Kontchou, G, Beaugrand, M. **Hepatocelullar carcinoma in patients with hepatitis C virus related chronic liver disease.** World J Gastroenterol 2007; 13 (17): 2455-2460.

Triola, MF, **Introdução à estatística.** 7ª. ed. tradução por Alfredo Alves Farias. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora SA 1998. Tradução de Elementary Statistics.

Trotta, PP, Antonelle, G, Baush, J, Williams, BRG, Spiegel, RJ, von Wussow, P. **Approval standards for alfa interferon subtypes.** Drug Inf J 2000; 34: 1231-1246.

United States of America, Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients Q7A**. 2001. Baltimore: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index/htm>; 2001.

United States of America. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. **Investigating out of specification (OOS) test results for pharmaceutical production**. Draft guidance. 1998. Baltimore: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index/htm>; 1998.

United States of America. **The United States Pharmacopeia – USP**. Convention 12601. 30 th ed. Port City Press; 2007.

Van der Wiele, T, Dale, B, Williams, R. **Business improvement through quality management systems**. Manag Decision 2000; 38 (1): 19-23.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, SENAI, Departamento Nacional. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia: Portaria INMETRO n. 29**, 1995. Rio de Janeiro: Senai; 2007.

Walsh G. **The cytokines: The interferon family**. In: **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology**. 2nd ed, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2003.

World Health Organization. **Technical report series n. 908. 37^o report Anexo 7. Application of Hazard Analysis and critical control point (HACCP) methodology to pharmaceuticals**. Geneva, WHO, 2003.

World Health Organization. **Technical report series n. 823. Good Manufacturing Practices**. Geneva, 2003.

Zarrin, A, Foroozesh, M, Hamidi, M, Mohammadi-Samani, S. **A simple and rapid HPLC method for quantification of interferon α 2b in dosage forms and delivery systems**. Journal of Chromatogr B Biomed Sci Appl 2006; 833: 199-203.

7 Anexo

7.1 Anexo 1: Procedimento GGLAS 02/17025. Critérios para habilitação de laboratórios analíticos em saúde segundo os princípios da ISO/IEC 17025.