Universidade do Estado do Rio De Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Miguel Angel de la O Herrera

Aplicação de ferramentas de análise de riscos para qualificação de equipamentos das principais operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante

Rio de Janeiro

2018

Miguel Angel de la O Herrera

Aplicação de ferramentas de análise de riscos para qualificação de equipamentos das principais operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante.

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Profª. Drª. Elezer Monte Blanco Lemes

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

H564 Herrera, Miguel Angel de la O

Aplicação de ferramentas de análise de riscos para qualificação de equipamentos das principais operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante. / Miguel Angel de la O Herrera. – 2018.
192 f.

Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa
Aderval Severino Luna
Elezer Monte Blanco Lemes

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biotecnologia - Teses 3. Avaliação de riscos- Teses 4. Biomassa – Teses I. Costa, Antonio Carlos Augusto da II. Luna Aderval Severino III. Lemes , Elezer Monte Blanco IV. Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 620.95

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

_____ _____

Assinatura Data

Miguel Angel de la O Herrera

Aplicação de ferramentas de análise de riscos para qualificação de equipamentos das principais operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 19 de março de 2018.
Orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química - UERJ

Prof. Dr. Aderval Severino Luna
Instituto de Química - UERJ

Profrª. Dra. Elezer Monte Blanco Lemes
Bio-Manguinhos - Fiocruz

Banca Examinadora:

_____
Profª. Dra. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química - UERJ

_____
Prof. Dr. André Luis Alberton
Instituto de Química - UERJ

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

_____
D. Sc. Irene Maria Testoni
Bio-Manguinhos - Fiocruz

_____
Profª. Dra. Elizabeth Valverde Macedo
LURAEx - UFF

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me colocado neste caminho de bênçãos e pela graça de me permitir concluir este trabalho.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, cunhados, cunhadas e meus sogros que sempre estão no meu coração e são o meu apoio em todos os momentos.

E especialmente para Maria Pia, Miguel e Christian, que amo com todas as forças do meu coração, e são a alegria da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Elezer Monte Blanco Lemes – por ser uma mentora no âmbito profissional e pessoal, me guiando sempre a procurar novos desafios e metas.

Aos Professores Doutores Aderval Luna e Antonio Carlos Augusto da Costa - pelo apoio, paciência e orientação que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A Regina Santos de Azevedo Alves, Msc. Eg. e ao Eng. Gilberto Talina – por compartilharem seus conhecimentos, indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho – pela companhia, amizade e todas as experiências vivenciadas juntos.

Ao Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por me permitir formar parte desta ilustre instituição

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos – por ter me dado a honra de fazer parte de tão ilustre instituição.

Ao Brasil, que ainda não ter nascido neste pais, me acolheu e me deu todo o necessário para chamá-lo de lar.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Martin Luther King Jr.

RESUMO

HERRERA, Miguel Angel de la O. *Aplicação de ferramentas de análise de riscos para qualificação de equipamentos das principais operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante*. 2018. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A transformação de matérias primas na indústria de processos é o resultado de um conjunto de fatores, como por exemplo a aplicação de operações unitárias que em conjunto com microrganismos e uma fonte de energia, transformam as matérias num produto de interesse. No caso particular da indústria biofarmacêutica, as operações unitárias utilizadas para geração de biomassa recombinante, são processos responsáveis por favorecer as funções metabólicas de microrganismos. Não obstante, não existe uma metodologia especifica que possa ser utilizada para a identificação, avaliação e tratamento de riscos nas operações unitárias utilizadas dentro processos biotecnológicos. Este trabalho propõe a integração da metodologia de Análise de Modo e Efeito de Falha (*FMEA*), e o Estudo de Perigos e Operabilidade (*HAZOP*) considerando os componentes de cada ferramenta mais adequados para avaliação de riscos nas operações unitárias envolvidas na etapa a montante em um processo de produção de biomassa recombinante, tendo como objetivo principal identificar a priorização de tratamento para controle dos riscos. O procedimento desenvolvido para a análise de riscos neste trabalho foi definido da seguinte forma: a) definir a fronteira (limites) da etapa analisada; b) caracterizar as etapas em subunidades, equipamentos ou sistemas; c) selecionar em determinada operação unitária um componente (parâmetro); d) elencar os desvios, causas, efeitos e controles para cada uma das operações unitárias identificadas; e) estabelecer valores quantitativos do grau de severidade, probabilidade dos eventos baseados nos modelos de Markov, e nível de detecção; f) determinar o Número de Prioridade de Risco (NPR) a partir dos valores gerados anteriormente e classifica-los como altos, médio e baixos; g) propor ações para reduzir o nível de impacto dos desvios. Uma vez concluída a aplicação da metodologia integrada foram definidas 05 etapas; na etapa de propagação celular, foram observados 04 nós com 15 desvios, sendo 20% com NPR médio e 80% com NPR baixo. Na etapa de biorreação foram identificados 11 nós com 33 desvios, sendo 97% de NPR baixo e 03% médio. Na centrifugação do cultivo

foram definidos 06 nós e 21 desvios, sendo 62% de NPR baixo e 38% médio. Na etapa de ruptura celular 06 nós e 17 desvios, sendo 76% de NPR baixo e 24% médio. Na centrifugação e lavagem dos corpos de inclusão foram determinados 06 nós com 22 desvios em 06 nós, formado por 68% dos desvios com NPR baixo e 32% médio. Com base na análise dos resultados obtidos foi possível concluir que a metodologia proposta permitiu identificar os principais riscos inerentes ás operações unitárias no processo. Observou-se também que a utilização do NPR facilitou a decisão para priorizar o atendimento dos riscos com menor capacidade de detecção, independentemente do nível de risco.

Palavras-chave: Risco. HAZOP. FMEA. Biotecnologia. Qualificação. Biomassa recombinante.

ABSTRACT

HERRERA, Miguel Angel de la O. *Application of risk analysis tools for equipment qualification of the main unit operations of a recombinant biomass production plant*. 2018. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The transformation of raw materials into products in the process industry is the result of applying unit operations with a power source, where materials are manipulated to transform them into products of interest. In the particular case of the biopharmaceutical industry, unit operations used to generate recombinant biomass processes are responsible for promoting the metabolic functions of microorganisms. However, there is no a certain methodology that can be utilized for the identification, evaluation, and treatment of risks in unit operations used in biotech processes. This research proposes the integration of FMEA and HAZOP methodologies considering the most appropriate elements for risk assessment in the unit operations involved in the upstream stages in a recombinant biomass process, with the primary objective to identify and prioritize treatment to control the risks. The procedure developed for risk analysis in this study was defined as follows: a) The limit of the analyzed phase was defined; b) Each stage was divided into subunits, equipment or systems; c) It was selected a unit operation used in the equipment (parameter); d) Deviations, causes, effects and controls for each of the identified unit operations were established; e) Quantitative values of the degree of severity, probability of events based on Markov chain models, and detection level were estimated; f) The Risk Priority Number (RPN) from the values generated previously was determined and classify them as High, Medium and Low; g) Actions were proposed to reduce the level of impact of the deviations.After implementation of the integrated methodology, 05 critical stages were defined. In the cellular propagation stage, 15 deviations were observed in 04 nodes, 20% with medium RPN and 80% with low RPN. For bioreaction stage, 33 deviations were identified in 11 nodes, being 97% with low NPR and 03% medium. In the case of centrifugation of the bacterial culture were defined 06 nodes and 21 deviations, with 62% of low RPN and 38% medium. The cell disruption stage is comprised of 06 nodes with 17 deviations, 76% low RPN and 24% medium. In the inclusion bodies centrifugation and washing stage, 06 nodes and 22 deviations were identified, being

68% low RPN and 32% medium. Based on the analysis of the results it was concluded that the proposed methodology allowed identifying the main risk that is inherent to unit operations within processes. Also, the using of the NPR facilitated the decision to prioritize the treatment of the most critical risks in the system independently of the risk level.

Keywords: Risk. HAZOP. FMEA. Biotech. Qualification. Recombinant Biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tecnologia para obtenção do ADN recombinante..... 29

Figura 2 - Processo de preparo do sifão para produção de biomassa recombinante..... 34

Figura 3 - Sistema de Biorreação Bacteriana para produção de biomassa recombinante..... 36

Figura 4 - Sistema de centrifugação e inativação de cultivo bacteriano..... 37

Figura 5 - Sistema de Ruptura Celular por homogeneização de alta pressão 38

Figura 6 - Trajetória de uma partícula dentro de um dispositivo de sedimentação por centrifugação..... 38

Figura 7 - Fluxograma de um processo convencional que transforma uma determinada matéria-prima em um produto final utilizando operações unitárias e energia..... 40

Figura 8 - Tipos de impelidores utilizados comumente para otimizar a agitação em biorreatores..... 44

Figura 9 - Funcionamento de uma bomba peristáltica..... 45

Figura 10 - Tipos de desenhos de camisa para tanques com controle de temperatura..... 45

Figura 11 - Condensador de dois passos utilizado para recuperação de líquidos e controle de temperatura dos gases de exaustão de um sistema de fermentação..... 46

Figura 12 - Trajetória de uma partícula dentro de um dispositivo de sedimentação por centrifugação..... 48

Figura 13 - Diagrama do funcionamento de um homogeneizador de alta pressão para rompimento de células recombinantes..... 49

Figura 14 - Mecanismos de Filtração..... 50

Figura 15- Avaliação da eficiência de retenção de partículas em filtro para ar.. 51

Figura 16 - Estrutura geral do processo de Gestão de Risco para Qualidade (GRQ)..... 56

Figura 17 - Metodologia da ferramenta FMEA para identificação de riscos..... 63

Figura 18 - Etapas de um Plano de Gerenciamento da ferramenta HAZOP para identificação de riscos..... 65

Figura 19 - Matriz de Transição para cálculo da probabilidade em n períodos... 68

Figura 20 - Matriz de cálculo do nível de risco resultante do produto da severidade e a frequência (ou probabilidade)..... 79

Figura 21 - Procedimento da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA..... 82

Figura 22 - Etapas de geração de biomassa recombinante no sistema de biorreação da planta de procariotos..... 86

Figura 23 - Etapas de rompimento celular e lavagem dos corpos de inclusão... 87

Figura 24 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de propagação celular..... 121

Figura 25 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de propagação celular..... 122

Figura 26 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de propagação celular..... 123

Figura 27- Distribuição do NPR na etapa de propagação celular..... 124

Figura 28 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de biorreação..... 126

Figura 29 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de biorreação. 127

Figura 30 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de biorreação..... 128

Figura 31 - Distribuição do NPR na etapa de biorreação..... 129

Figura 32 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de centrifugação do cultivo..... 130

Figura 33 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de centrifugação do cultivo..... 131

Figura 34 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de centrifugação do cultivo..... 132

Figura 35 - Distribuição do NPR na etapa de centrifugação do cultivo celular... 133

Figura 36 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de ruptura celular 135

Figura 37 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de ruptura celular..... 136

Figura 38 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de ruptura celular..... 137

Figura 39 - Distribuição do NPR na etapa de ruptura celular..... 138

Figura 40 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de centrifugação e lavagem..... 140

Figura 41 - Distribuição da frequência dos desvios na etapa de centrifugação e lavagem..... 141

Figura 42 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de centrifugação e lavagem..... 142

Figura 43 - Distribuição do NPR na etapa de centrifugação e lavagem..... 143

Figura 44 - Probabilidade inicial proposta vs. a probabilidade calculada pela matriz de Markov..... 146

Figura 45 - Efeitos da probabilidade calculada no nível de risco (NR) = S x P... 147

Figura 46 - Efeitos da probabilidade calculada com matriz de Markov no NPR. 148

Figura 47 - Histograma dos NPR considerando todas as possíveis combinações de severidade, probabilidade e detecção..... 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de operações unitárias físicas mais utilizadas dentro da indústria de processos..... 41

Tabela 2 - Índices de probabilidade e frequência que representam a ocorrência de eventos durante a avaliação do nível de risco..... 76

Tabela 3 - Critérios para identificação do nível de severidade para a ferramenta FMEA dentro da indústria biofarmacêutica..... 78

Tabela 4 - Critérios para identificação do nível de detectabilidade para a ferramenta FMEA dentro da indústria biofarmacêutica..... 79

Tabela 5 - Escala de priorização de ações para redução do NPR..... 81

Tabela 6 - Planilha da metodologia integrada das ferramentas de análise de risco FMEA e HAZOP..... 84

Tabela 7 - Condições de operação do processo de propagação celular, biorreação e centrifugação do cultivo bacteriano segundo a capacidade do sistema..... 85

Tabela 8 - Condições de operação do processo de rompimento celular, centrifugação e lavagem dos corpos de inclusão, segundo a capacidade do sistema..... 87

Tabela 9- Identificação das operações unitárias mais críticas utilizadas no processo produtivo de proteínas recombinantes na etapa a montante..... 88

Tabela 10 - Relação das Operações Unitárias do processo de produção de biomassa recombinante com parâmetros e desvios no processo 89

Tabela 11 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro velocidade na operação unitária de Agitação..... 91

Tabela 12 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Temperatura na operação unitária de Transferência de Calor..... 95

Tabela 13 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Filtração..... 99

Tabela 14 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Volume na operação unitária de Bombeamento..... 103

Tabela 15 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Rotação na operação unitária de Bombeamento..... 104

Tabela 16 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Bombeamento..... 105

Tabela 17 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro QO_2 na operação unitária de Absorção..... 108

Tabela 18 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Temperatura na operação unitária de Condensação..... 110

Tabela 19 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Condensação..... 111

Tabela 20 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Tempo na operação unitária de Centrifugação..... 114

Tabela 21 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Centrifugação..... 115

Tabela 22 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Nível na operação unitária de Centrifugação..... 116

Tabela 23 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Pressão na operação unitária de Compressão..... 118

Tabela 24 - Nós da etapa de propagação celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo..... 120

Tabela 25 - Nós da etapa de biorreação e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo..... 125

Tabela 26 - Nós da etapa de centrifugação celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo..... 130

Tabela 27 - Nós da etapa de rompimento celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo..... 134

Tabela 28 - Nós da etapa de centrifugação e lavagem, e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo..... 139

Tabela 29 - Probabilidade calculada a partir da matriz de transição de Markov para análise de risco da metodologia integrada HAZOP e FMEA... 145

Tabela 30 - Distribuição de valores de NPR em sistemas 10 x 10 x 10..... 149

Tabela 31 - Equações para o cálculo da velocidade radial e tangencial para um sistema de agitação..... 188

Tabela 32 - Cálculo da vazão de uma bomba peristáltica 188

Tabela 33 - Cálculo da transferência de calor em tanques encamisados com um agitador convencional..... 188

Tabela 34 - Cálculo do coeficiente de transferência de calor interno (hi) na condensação no interior de tubos na horizontal que determinada o vapor a alta velocidade..... 189

Tabela 35 - Determinação da velocidade específica de respiração de um cultivo bacteriano considerando as frações molares de oxigênio... 189

Tabela 36 - Equações para definir o comportamento das partículas no recipiente de centrifugação..... 190

Tabela 37 - Determinação da eficiência de ruptura após homogeneização. 190

Tabela 38 - Índices de ocorrência considerando lotes com defeitos, intervalo de tempo, e probabilidade do evento acontecer..... 191

Tabela 39 - Critérios de identificação do impacto da severidade dos desvios considerando dano a operadores, danos à estrutura, impacto ambiental, dano aos clientes, exigência regulatória e dano ao produto..... 192

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHP	Processo Analítico Hierárquico (Analytic Hierarchy Process)
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BPF	Boas Práticas de Fabricação (cGMP)
BCT	Banco de células de trabalho
CIP	Limpeza no local (Clean In Place)
DOE	Planejamento de Experimentos (Design of Experiment)
DOWNSTREAM	Etapa de purificação de produtos biotecnológicos
E. Coli	Escherichia Coli
ERU	Especificação de Requisitos do Usuário
HACCP	Análise de Risco de Pontos Críticos de Controle (Hazard Analysis and Critical Control Points)
HAZOP	Estudos de Perigo e Operabilidade (HAZard and OPerability study)
ICH	Conselho Internacional de Harmonização (International Council on Harmonisation)
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFN	Interferon
ISO	Organização Internacional de Normatização (International Organization for Standardization)
ISPE	Sociedade Internacional de Engenharia Farmacêutica (International Society for Pharmaceutical Engineering)
FMEA	Análise de Modos de Falhas e Efeitos (Failure Mode and Effect Analysis)
FMECA	Análise do Modo de Falha, Efeitos e Criticalidade (Failure Mode, Effects and Criticality Analysis

FTA	Análise da Árvore de Falhas (Fault Tree Analysis)
mABs	Anticorpos Monoclonais (Monoclonal Anti-Body)
NIRS	Espectroscopia de infravermelho próximo (Near Infrared Spectroscopy)
NPR	Número de Priorização de Riscos (Risk Priority Number – RPN)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDP	Parcerias para Desenvolvimento Produtivo
PHA	Análise Preliminar de Perigos (Preliminary Hazard Analysis)
PNI	Programa Nacional de Imunizações
POP	Procedimento Operacional Padrão
QD	Qualificação de Desenho
QI	Qualificação de Instalação
QO	Qualificação de Operação
QP	Qualificação de Desempenho (Performance)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Revoluções por minuto
SIP	Esterilização no local (Sterilization in Place)
STR	Reator Tanque Agitado (Stirred-Tank Reactor)
UPSTREAM	Etapa de fermentação e recuperação de produtos biotecnológicos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	21
1.	**OBJETIVOS**.....	27
1.1	**Objetivo Geral**.....	27
1.2	**Objetivos Específicos**.....	27
2.	**MARCO TEÓRICO**.....	29
2.1	**Processo produtivo de biomassa recombinante (montante)**.....	29
2.1.1	Importância da produção de biomassa recombinante para produção de proteínas terapêuticas.....	31
2.1.2	Etapa de Propagação Celular.....	34
2.1.3	Etapa de Biorreação.....	34
2.1.4	Etapa de Recuperação da Biomassa.....	36
2.1.5	Rompimento Celular.....	37
2.1.6	Lavagem dos Corpos de Inclusão.....	38
2.2	**Operações unitárias nos processos produtivos**.....	39
2.2.1	Operações Unitárias em sistemas de produção de biomassa recombinantes.....	42
2.3	**Qualificação de Equipamentos**.....	51
2.3.1	Definição e objetivo da qualificação.....	52
2.3.2	Tipos de qualificação.....	53
2.4	**Gestão de Risco na Industria Biofarmacêutica**.....	54
2.4.1	Ferramentas de Análise de Risco.....	59

2.4.1.1 Análise de Modo de Falha e Efeitos – FMEA..... 62

2.4.1.2 Estudo de Perigos e Operabilidade – HAZOP..... 63

2.4.2 Determinação da probabilidade eventos não desejados..... 65

2.4.2.1 Processos Estocásticos..... 66

2.4.2.2 Cadeias de Markov..... 67

2.5 **Estudo de Caso**..... 68

2.5.1 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BIO-MANGUINHOS..... 71

3. **METODOLOGIA**..... 73

3.1 **Integração das ferramentas de Análise de Perigos e Operabilidade (HAZOP) e Análise de Modo de Efeito de Falha (FMEA) para avaliação de riscos**..... 73

3.1.1 Avaliação dos componentes das ferramentas HAZOP e FMEA para definição da metodologia integrada de análise de risco..... 74

3.2 **Aplicação da metodologia integrada e elaboração do registro da avaliação de riscos**..... 83

4. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 85

4.1 **Descrição do Processo**..... 85

4.2 **Aplicação da Metodologia Integrada de Análise de Risco**..... 89

4.2.1 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Agitação..... 90

4.2.2 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Transferência de Calor..... 94

4.2.3 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Filtração..... 97

4.2.4 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Bombeamento..... 101

4.2.5 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Absorção..... 106

4.2.6 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Condensação..... 108

4.2.7 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Centrifugação..... 112

4.2.8 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Compressão..... 116

4.3 **Avaliação da Severidade, Probabilidade, Detecção e NPR nas etapas do processo produtivo de biomassa recombinante**..... 120

4.3.1 Propagação Celular..... 120

4.3.2 Biorreação..... 124

4.3.3 Centrifugação do Cultivo..... 130

4.3.4 Ruptura Celular..... 134

4.3.5 Centrifugação e Lavagem..... 139

4.4 **Análise dos efeitos da probabilidade calculada com matrizes de Markov no nível de risco e NPR**..... 143

CONCLUSÕES..... 152

REFERENCIAS..... 154

ANEXO A–Relatório de Análise de Risco utilizando a metodologia integrada HAZOP e FMEA..... 178

ANEXO B – Equaçõesdas operações unitárias comumente utilizadas em processos biotecnológicos..... 188

ANEXO C–Critérios de severidade e frequência utilizados para definição do nível de risco utilizando a metodologia HAZOP..... 191

INTRODUÇÃO

A interpretação do conceito de qualidade é bastante subjetiva, na grande maioria das vezes está relacionado a percepção ou expectativa de um serviço prestado ou de um produto. Dentro da indústria farmacêutica costuma-se definir como o produto estar em conformidade com as exigências dos clientes, ter valor agregado, ter algo que produtos similares não possuem, relação custo/benefício, entre outros. O conceito de qualidade farmacêutica se reflete em indicadores de qualidade, seja em função do desenvolvimento de novas tecnologias ou de rigores regulatórios (normativos).

Com o apelo da globalização foi criado o modelo normativo ISO Organização Internacional de Normatização (International Organization for Standardization) em 1994. A norma ISO 8402 (1994) vai além destes conceitos e propõe um modelo de Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade e define que: “A qualidade é o conjunto de propriedades e características de um produto ou serviço que lhe confere a capacidade de satisfazer as necessidades explicitas e implícitas”.

Assim, a qualidade é a consequência do esforço planejado e não é produto da casualidade, que nasce no desenho do produto, passa pela produção deste, e termina na satisfação do cliente. Já a ISO 9001 (2015), estabelece os requisitos de um Sistema de Gestão da Qualidade complementando assim esta abordagem com a definição de riscos e oportunidades, estabelecendo a base para o aumento da eficácia do sistema. Em 2009, foi publicada a norma ISO 31000 (2009) genericamente aplicável ao gerenciamento de todas as formas de risco em qualquer contexto industrial (PURDY, 2010). Nesse sentido, gerenciar riscos é um processo de otimização que promove o alcance do objetivo mais provável, assumindo que o risco é fato corriqueiro, não sendo inerentemente bom ou ruim.

A partir destes princípios, a Indústria Farmacêutica que está em constante processo de harmonização regulatória para tratar de temas como assuntos científicos, tecnológicos e recomendações para regulamentação do setor, sentiu a necessidade de contar com uma instituição que centralizasse todas as suas iniciativas, desta forma foi criado em 1990 a Conferência Internacional de Harmonização (hoje conhecido como Conselho Internacional de Harmonização - ICH).

Dentre seus diferentes guias destaca-se o guia ICH-Q9, que estabelece os princípios e exemplos das ferramentas para gestão de risco a qualidade e a sua aplicação nos diferentes aspectos da qualidade farmacêutica, que procura manter os padrões de qualidade de um produto ante qualquer ente regulador. Ainda que o ICH estabeleça que uma ferramenta ou conjunto de ferramentas não são aplicáveis para todas as situações em que um gerenciamento de riscos a qualidade seja executado, o guia ICH-Q9 orienta a parte interessada, para selecionar os instrumentos de gestão de risco mais adequado de forma completamente dependente de fatos e circunstancias particulares.

No Brasil, a RDC nº 17/2010 (BRASIL, 2010) esclarece que as Boas Práticas de Fabricação (BPF) estão orientadas primeiramente à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados, e podem ser compreendidas como “a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro”.

É desta forma, que o ICH e a RDC 17/2010, convergem na necessidade de estabelecer um sistema de gerenciamento de riscos e utilizar ferramentas que permitam identificar, analisar, e tratar os riscos dentro da cadeia completa de um processo gerador de insumos farmacêuticos. Desta forma, para garantir o nível esperado de qualidade da cadeia de produção, as BPFs estabelecem que é preciso haver a comprovação que todos os aspectos críticos de operação estão sob controle, por meio da definição e documentação clara e objetiva em um Plano Mestre de Validação, que seja estruturado a partir de um programa de qualificação e validação antes de começar com a produção de rotina (BRASIL, 2010).

Complementarmente, a autorização para o início da produção, é dependente da liberação técnica da área para operar através da emissão do certificado de Condições Técnico-Operacionais (CTO) por parte da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é considerada como uma classificação aplicada em território nacional dos estabelecimentos ou linhas de produção em início de atividades ou também às linhas de produção já existentes quando da inclusão de nova forma farmacêutica ou classe de risco, que possuem capacidade técnica e operacional

adequada à fabricação em escala industrial de medicamentos ou produtos para saúde (BRASIL, 2010).

Isto posto, a qualificação de equipamentos que faz parte do processo de validação, foi reconhecida como o ponto focal que permite a comprovação que os processos operam dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF), e/ou estão prontos para receber a autoria pelos órgãos certificadores, considerando que que no caso da sua ausência, um processo não está permitido de entrar em operação, independentemente da qualidade técnica do sistema, e do nível de sofisticação utilizado durante a sua construção e montagem da infraestrutura.

É neste ponto especifico, que recentemente dentro da indústria farmacêutica foi percebida a necessidade de estabelecer uma estratégia que permita otimizar o processo de qualificação de sistemas e equipamentos de um processo, se esperando como resultado a redução de tempo e recursos necessários para executá-lo. Para confrontar esta situação, uma nova abordagem sugere que a qualificação de equipamentos seja baseada dentro do universo da análise de risco, onde por intermédio da análise do perfil das falhas potenciais ou desvios da função, frequência de eventos, grau de intensidade (ou severidade), e capacidade do sistema para detecção das falhas, sejam identificados os elementos mais críticos do processo, objetivando assim medidas de tratamento e controle, e finalmente permitindo responder os seguintes questionamentos: a) qual sistema ou equipamento é candidato para ser qualificado?; b) o que deve ser qualificado e validado?; c) saber se o sistema ou equipamento atende aos requerimentos exigidos. Somente a partir dessas informações, será possível estabelecer o nível de qualificação e a profundidade dos testes que serão realizados que permitam garantir a operação e resultados atendendo os quesitos de qualidade.

Em Bio-Manguinhos, que é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional, as qualificações de equipamentos e sistemas anteriormente mencionadas, já fazem parte de uma estrutura de avaliação realizada pelo Departamento de Garantia da Qualidade da unidade, e são concretizadas de acordo com os standards e normas vigentes que são aplicáveis para indústria farmacêutica exclusivamente (ISO, ISPE).

Estas qualificações, seguem procedimentos nos quais diversos ensaios técnicos são realizados previamente à operação, por um grupo de especialistas em calibração e validação, especialista em processos, engenharia, e qualidade, entre outros, que em conjunto trabalham com o objetivo comum de comprovar a adequação da funcionalidade do equipamento, e atestar que o desempenho e especificação cumprem o objetivo pelo qual foram desenhados.

No entanto, em virtude da utilização de novas tecnologias que são aplicadas constantemente para otimizar os processos e melhorar a qualidade dos produtos, os principais equipamentos utilizados na etapa da montante no processo estudado neste trabalho, tais como, o sistema de biorreação, sistemas de transferência de produto, centrífugas de fluxo continuo, tanques de processo, sistemas de homogeneização de alta pressão, e equipamentos de suporte avaliados neste trabalho, não seguem exatamente o mesmo desenho, especificação técnica, e estratégias de controle dos equipamentos de outros processos que estão em operação atualmente dentro da unidade (Bio-Manguinhos).

Além disso, estes sistemas estão compostos por uma ampla gama de componentes, com características, funções e objetivos diferentes. Desta forma, em virtude dos inúmeros ensaios que precisam ser realizados para realizar as diversas qualificações pode-se esperar que a realização do processo de qualificação dos equipamentos utilizados durante a produção, e a validação do processo como um todo, precise meses ou inclusive anos para ser concluído, prolongando assim, as expectativas para iniciar a produção de rotina, e possivelmente incrementando os recursos necessários para concretizar este fim.

Foi a partir desta premissa, que a utilização de ferramentas de análise de risco foi considerada como uma opção para reduzir os impactos do processo de qualificação. Assim, a ferramenta de análise operacional também conhecida como HAZOP (que tem uma abordagem de análise técnico de sistemas e equipamentos), e a ferramenta de análise dos modos de falhas FMEA (que analisa desvios da função esperada do sistema), destacam-se como opção para dar suporte no processo de qualificação a razão das suas características. Tendo em conta que cada uma destas metodologias atende alvos qualitativos e quantitativos específicos, o resultado da avaliação nessas abordagens é de interesse para a qualificação porque pode

apresentar um perfil das falhas que pode ser quantificado e apresentado como suporte ante o órgão regulador.

Portanto, estas ferramentas se fundiram na proposta apresentada neste trabalho, com a expectativa de se tornarem uma metodologia integrada ou inclusive complementar, que através do estabelecimento de um procedimento padronizado, possa ser institucionalizada, inovando assim, a forma em que atualmente Bio-Manguinhos/Fiocruz realiza as qualificações, tendo ganhos técnico-operacionais, garantindo o objetivo da planta para produção de proteínas terapêuticas a partir do uso de tecnologia recombinante em bactérias. Onde, um projeto desenhado para produção de biomassa recombinante que está prestes a começar com as etapas de qualificação, foi escolhido como um objeto de estudo para aplicação da metodologia integrada proposta neste trabalho.

Suplementarmente, foi proposta uma nova abordagem para definição da probabilidade de eventos. Comumente, as metodologias de gestão de risco utilizam bases de dados onde registros de falhas e desvios ficam plasmados, e servem como base para identificar uma linha de tendência e predição de eventos futuros. Como mencionado anteriormente, o sistema estudado foi construído sob características técnicas especificas, sendo mais inovadoras quando comparadas com os sistemas que estão em operação, e inclusive, alguns equipamentos serão utilizados pela primeira vez dentro da unidade.

Por este motivo, foi considerada a utilização de ferramentas estatísticas como modelos probabilísticos (ou estocásticos) chamados *cadeias de Markov* para dar suporte na avaliação de probabilidades segundo é sugerido pelo ICH e na ISO 31010 (2009). Estes modelos permitem estimar a probabilidade sem houver necessidade de informações ou registros de eventos anteriores, visando a redução da subjetividade ou falta de expertise por parte dos envolvidos na análise, e perfilando o estudo em um embasamento técnico-matemático.

Sendo assim, o intuito deste trabalho foi propor um método que permita facilitar o processo de qualificação de equipamentos e sistemas similares em plantas de produção de proteínas recombinantes, permitindo preservar a qualidade, segurança e eficácia da própria carteira de produtos e processos que caracteriza na missão da empresa. Da mesma forma, é evidente que recentemente dentro da indústria, existe uma clara necessidade de contar com especialistas com a

capacidade de compreensão e expertise na área de gestão de riscos. Portanto, espera-se que este trabalho, seja proveitoso dentro da área acadêmica, por médio da sua utilização como referência para futuras pesquisas relacionadas na análise de risco industrial ou para aprofundamento dos critérios seguidos na estruturação e aplicação de metodologias de análise de riscos.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do presente trabalho, é estruturar uma metodologia de análise de riscos que seja constituída a partir da consolidação das ferramentas de análise de risco HAZOP e FMEA, que em virtude da sua similaridade, comumente complementam-se dentro da indústria de processos durante a identificação, avaliação, e tratamento de riscos em sistemas, equipamentos, ou infraestrutura em geral. Objetivando assim, a identificação de riscos e operações unitárias mais críticas, que serão utilizadas como referência para otimizar o processo de qualificação de equipamentos, e sistemas, destinados ao processo de produção de biomassa recombinante em uma planta para Plataforma Procariótica.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar as operações unitárias mais críticas nos equipamentos de processo e definir os parâmetros operação na produção de biomassa recombinante.
b) Mediante a aplicação da metodologia integrada das ferramentas de análise de risco HAZOP e FMEA, identificar as causas e consequências dos riscos nas operações unitárias dos equipamentos e sistemas utilizados na etapa a montante da produção de biomassa recombinante, e desta forma propor medidas de mitigação para tratamento de riscos.
c) Utilizar a matriz de transição (de Markov) para determinar a probabilidade dos eventos e reduzir o índice de subjetividade na participação equipe multidisciplinar durante a execução da análise de risco.
d) Com base no Número de Priorização de Risco (NPR) resultante da aplicação da metodologia integrada, determinar a priorização de tratamento de desvios nos parâmetros a serem avaliados durante a qualificação de equipamentos.
e) Elaborar o relatório de análise de risco que servirá como referência técnica durante a qualificação dos sistemas e equipamentos analisados neste trabalho.

f) Propor a metodologia integrada de análise de risco como suporte para qualificação de novos equipamentos, e difundir os conceitos de Gerenciamento de Risco a Qualidade por intermédio da aplicação de ferramentas de análise de risco em plantas industriais de produção biofarmacêutica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Processo produtivo de biomassa recombinante (montante)

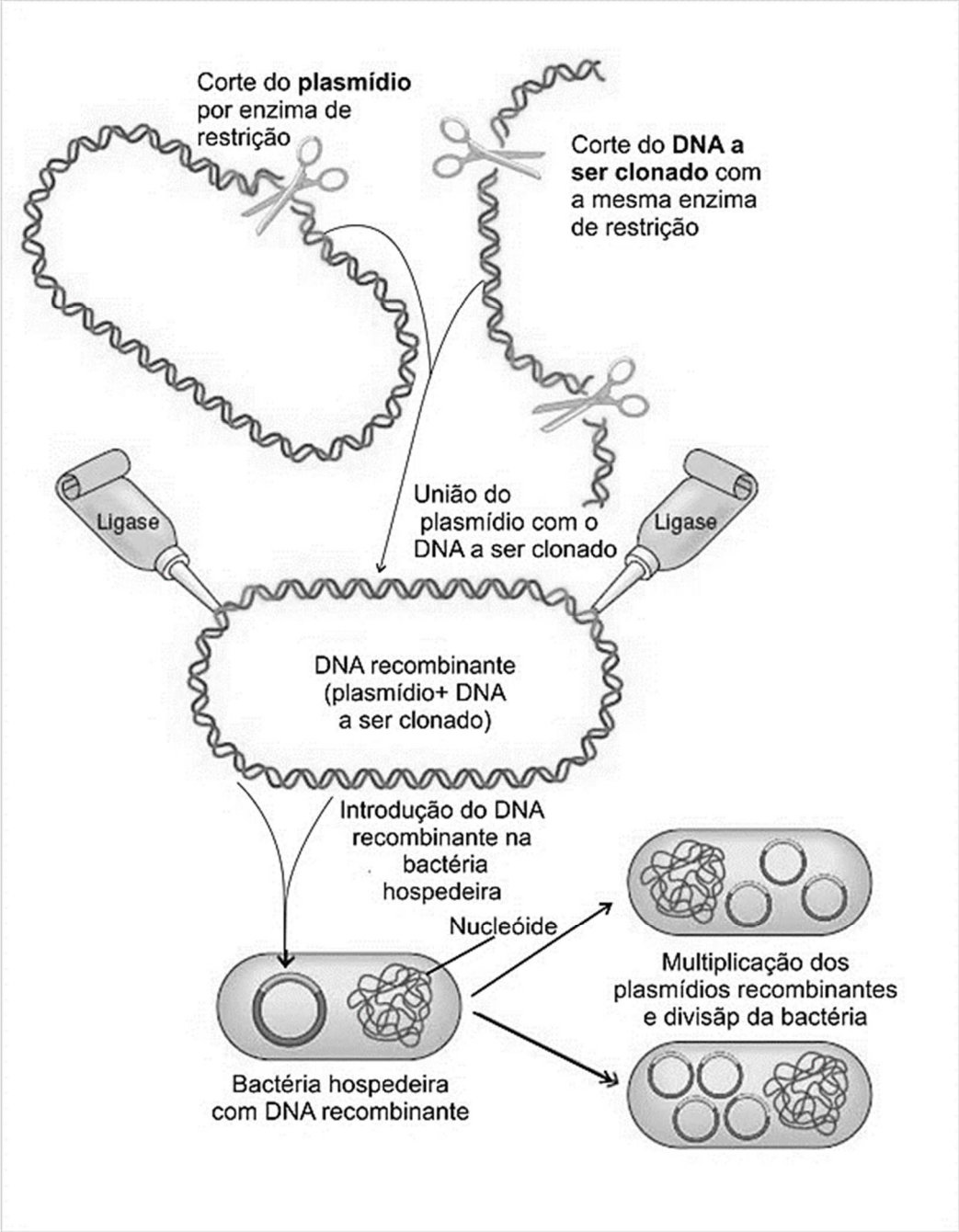
Para definir um processo biotecnológico, primeiramente é necessário estabelecer o conceito de tecnologia recombinante. Em décadas recentes, a tecnologia de ADN recombinante, também conhecida como engenharia genética, ou mais precisamente recombinação genética *in vitro,* revolucionou a biologia. A área da saúde teve grandes benefícios com o desenvolvimento desta tecnologia. Como exemplo, a pesquisa realizada nesta área é focada no diagnóstico de doenças e seu possível tratamento através da terapia com moléculas recombinantes e introdução de genes, vacinas, proteínas terapêuticas e anticorpos monoclonais.

Além disso, a manipulação genética tornou-se uma ferramenta fundamental para a eliminação de doenças crônicas e agravos para a saúde humana. Da mesma forma, Walsh (2002) define o termo *biofármaco* como substâncias farmacêuticas com base em proteínas ou de ácido nucleico utilizados para fins de diagnóstico *in vivo* ou terapêuticos, e são produzidos em plataformas biológicas diferentes que as fontes naturais (não modificadas). Assim, os biofármacos são uma classe de proteínas terapêuticas produzidas por técnicas biotecnológicas modernas, especificamente através de engenharia genética ou (no caso de anticorpos monoclonais) pela tecnologia de hibridomas.

A engenharia genética vem contribuindo também na área da saúde, para realizar diagnósticos mais rápidos e precisos de algumas doenças e para encontrar a cura. A produção da insulina humana foi uma das primeiras aplicações comerciais de microrganismos transgênicos, antes ela era extraída de porcos e causava reações alérgicas com frequência, hoje a insulina recombinante se tornou mais segura e aumentou a eficiência no tratamento de pacientes com diabetes.

Na Figura 1 é apresentado o processo tradicional de obtenção do ADN recombinante apresentado por Spartaco et al (2005).

Figura 1 – Tecnologia para obtenção do ADN recombinante.



Fonte: SPARTACO, et al., 2005.

Procedimento da Tecnologia de ADN Recombinante.

- O procedimento geralmente envolve o isolamento de um gene humano com potencial terapêutico (por ex. insulina) e a introdução desse gene numa célula animal, bacteriana ou de leveduras.

- Através do uso de proteínas denominadas enzimas de restrição, são isolados genes individuais do ADN humano e inseridos em pequenos pedaços de ADN cortados com a mesma enzima, chamados plasmídeos.
- O plasmídeo recombinante é então inserido numa célula animal, bacteriana ou de levedura, num processo chamado transformação.
- Os genes de resistência a medicamentos, que também se encontram no plasmídeo, selecionam as células transformadas das não-transformadas.
- É então estabelecida uma população pura de células recombinantes através do processo de clonagem, onde uma única célula selecionada dará origem a uma população de clones.
- No fim do processo, espera-se que todas as células resultantes contenham uma cópia do plasmídeo portador do gene humano inserido.
- Depois do gene e da célula clonada serem inseridos, as células são então induzidas a expressar o gene humano.

Os processos utilizados na biotecnologia para produção de proteínas terapêuticas são divididos comumente nas operações a montante (*upstream*)que é considerada como a etapa de biorreação (multiplicação de microrganismo), e que neste trabalho pode ser definida como o conjunto de processos que inclui a elaboração do banco de células de trabalho (BCT), a propagação celular, biorreação, recuperação de biomassa, ruptura celular e lavagem dos corpos de inclusão, nos processos produzidos a partir de células procarióticas. Para complementar os processos de produção de proteínas recombinantes, as operações da etapa a jusante (*downstream*) que incluem os processos recuperação dos produtos e de sua purificação. Nesta etapa os insumos (intermediários) originados na etapa a montante são processados para satisfazer os requerimentos de pureza e qualidade (ROWLEY, 2010).

2.1.1 Importância da produção de biomassa recombinante para produção de proteínas terapêuticas

Como o objetivo principal da etapa a montante é criar o ambiente necessário para que as células produzam a proteína alvo, esta etapa cumpre com os seguintes propósitos; a biotecnologia é usada para produzir produtos como proteínas

terapêuticas, antibióticos, hormônios, enzimas, aminoácidos, substitutos do sangue e álcool. Também, podem ser usados como antígenos na produção de vacinas ou funcionam como hormônios terapêuticos, enzimas ou anticorpos contra uma determinada doença ou desordem. Linfoma, artrite reumatoide, diabetes mellitus e insuficiência do hormônio do crescimento são alguns exemplos dos agravos humanos que os produtos biofarmacêuticos podem tratar com sucesso, ao selecionar alvos proteicos específicos para serem produzidos por células vivas.

O produto de interesse pode ser excretado das células (geralmente no caso de células de mamíferos) ou pode ser intracelular (geralmente no caso de células bacterianas). Nos bioprocessos, o processamento a montante é abrange a geração de proteínas em bactérias ou células, obtidos por fermentação microbiana ou cultura de células de mamíferos, respectivamente.

Com a introdução da nova classe "proteínas recombinantes" no mercado, um novo paradigma para definição das substâncias também foi introduzido. Enquanto os compostos clássicos de baixo peso molecular foram definidos com base em suas características químicas e físicas, as proteínas recombinantes foram classificadas não apenas nessas características, mas também no processo de produção relacionado. "O produto definido pelo processo" tornou-se o novo paradigma com o entendimento de que todos os fármacos recombinantes são isolados de uma matriz extremamente complexa: uma célula viva.

A primeira plataforma de expressão estabelecida foi a *Escherichia coli* (E. coli), que veio com um grande conhecimento sobre genética, requisitos de cultivo simples, e um curto período de geração. Esta plataforma funcionou bem para insulina e hormônio de crescimento humano. Mas logo foi percebido que a E. coli tinha uma grave limitação: não era possível que estas células fizessem as modificações pós-tradução como por exemplo a glicosilação.

Ainda assim, este não foi um problema para a produção de insulina e hormônio de crescimento humano, uma vez que estas proteínas não sofrem glicosilação na sua forma humana natural. Favoravelmente, mesmo algumas proteínas terapêuticas conhecidas como biofármacos, tais como IFN-α, -β e -γ, interleucina-2, fator-α de necrose tumoral e outras, passam por modificação pós-tradução nas suas formas humanas naturais, tornaram-se medicamentos efetivos, mesmo após expressão em E. coli recombinante (DINGERMANN, 2008).

Da mesma forma, considerando a taxa intrínseca de crescimento elevado de E. coli, culturas de alta densidade celular são atualmente utilizadas para a produção de fragmentos de anticorpos monoclonais (mABs) (JALALIRAD, 2013). De acordo com Lee e Jeong (2015), estes mABs podem ser produzidos em E. coli tanto pela expressão periplasmática quanto citosólica. Isso é uma vantagem porque a E. coli pode ser cultivada rapidamente e atingir altos níveis de expressão. No entanto, como mencionado anteriormente, a E. coli não possui maquinaria de glicosilação, e, portanto, se a glicosilação for importante para a atividade, isso pode ser uma limitação significativa. Ainda assim, a E. coli tem sido amplamente empregada nos processos de produção de biofármacos, e na produção apenas de fragmentos de anticorpos (YIN, GARCES; YANG, 2012).

Os processos de produção com E. coli são comumente conduzidos em reatores de tanque agitado (STR) com processamento de glicose limitado, porque o excesso de glicose induz o metabolismo de transbordamento e provoca a produção do acetato inibidor de metabolitos. Como estratégia alternativa para alimentação limitada por fonte de carbono, diferentes abordagens de engenharia metabólica foram projetadas para prevenir ou pelo menos reduzir a formação de acetato. Essas abordagens incluem a manipulação da via de formação de acetato nativo e engenharia do sistema endógeno de absorção de glicose (LARA, 2008).

É desta forma que nas primeiras etapas do processo de produção tanto de biofármacos como de mABs, a produção de biomassa recombinante é uma etapa crítica, considerada por muitos pesquisadores e especialistas como um fator que define a eficiência do processo. Portanto o desenvolvimento de um novo processo de produção de proteínas terapêuticas e mABs, ou durante a otimização de processos na etapa a montante deve considerar as seguintes premissas para atingir o sucesso necessário: desenvolvimento e engenharia da linhagem celular, seleção de clones celulares, desenvolvimento do meio e alimentação, desenvolvimento de bioprocessos e potencial aumento de escala.

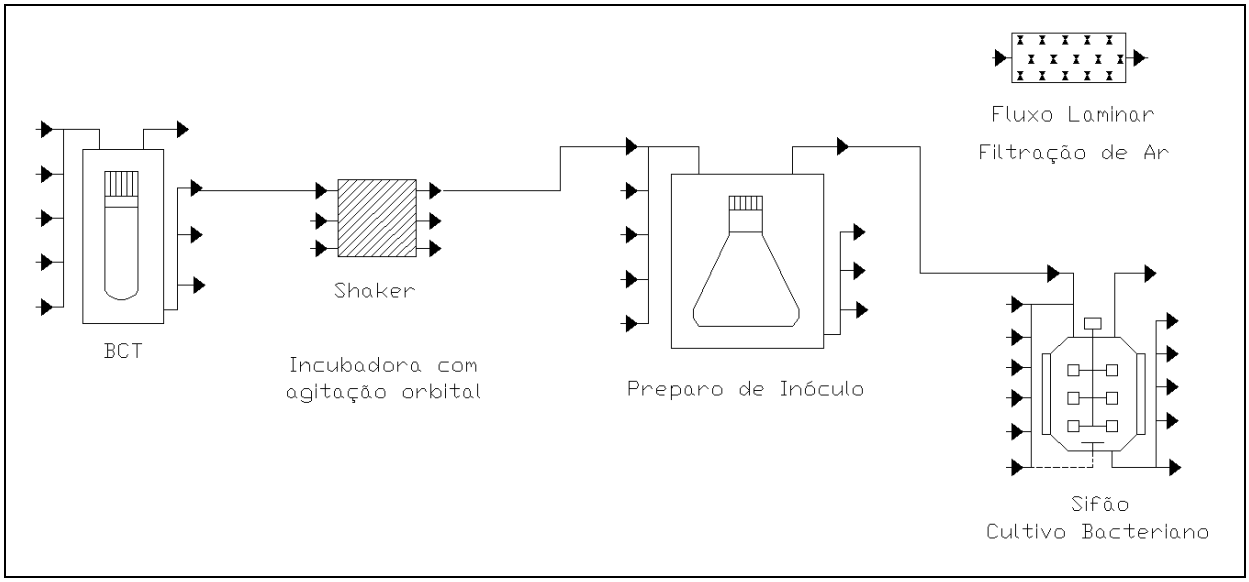
O desenho do reator, a colheita de células, o controle de processo e as análises correspondentes, também podem ser parte do processo de otimização. Essas áreas são otimizadas individualmente e se concentram em uma geração robusta de um alto título de produto, alta produtividade e qualidade definida.

A seguir, são descritas as operações que são executadas durante este processo de geração de biomassa recombinante.

2.1.2 Etapa de Propagação Celular

A atividade começa com a propagação de um banco de células de trabalho (*criopreservado*) utilizando pequenos volumes de meio de cultura constituído com os nutrientes necessários para manter o crescimento do microrganismo até a sua fase exponencial. Os principais parâmetros a serem considerados nesta etapa são a agitação, aeração e controle de temperatura (YANG et al., 2013). Em cada etapa de crescimento, o volume do meio é aumentado em até dez vezes seguindo as recomendações para crescimento de cultivos bacterianos (WIDDEL, 2010) até gerar o volume necessário para começar com o pre-inóculo da biorreação, este processo é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Processo de preparo do sifão para produção de biomassa recombinante.



Fonte: O autor, 2017.

2.1.3 Etapa de Biorreação

Como resultado da atividade metabólica dos microrganismos é produzida a biomassa contendo a proteína de interesse (ALTAMIRANO et al., 2013). As matérias primas estão conformadas por elementos que sofrem transformações dentro das células procarióticas como a bactéria *Escherichia coli* (plataforma produtiva deste sistema, aqui citado como Plataforma Procariótica). Para que essa atividade ocorra torna-se necessário que o balanço de nutrientes no meio de cultivo deva conter os

elementos essenciais como fontes de carbono e nitrogênio, enxofre, fósforo, cálcio e micronutrientes, etc. (WALKER, 2014); o pH e a temperatura do meio devem ser adequados para fomentar e manter o crescimento celular e evitar a degradação intracelular da proteína de interesse.

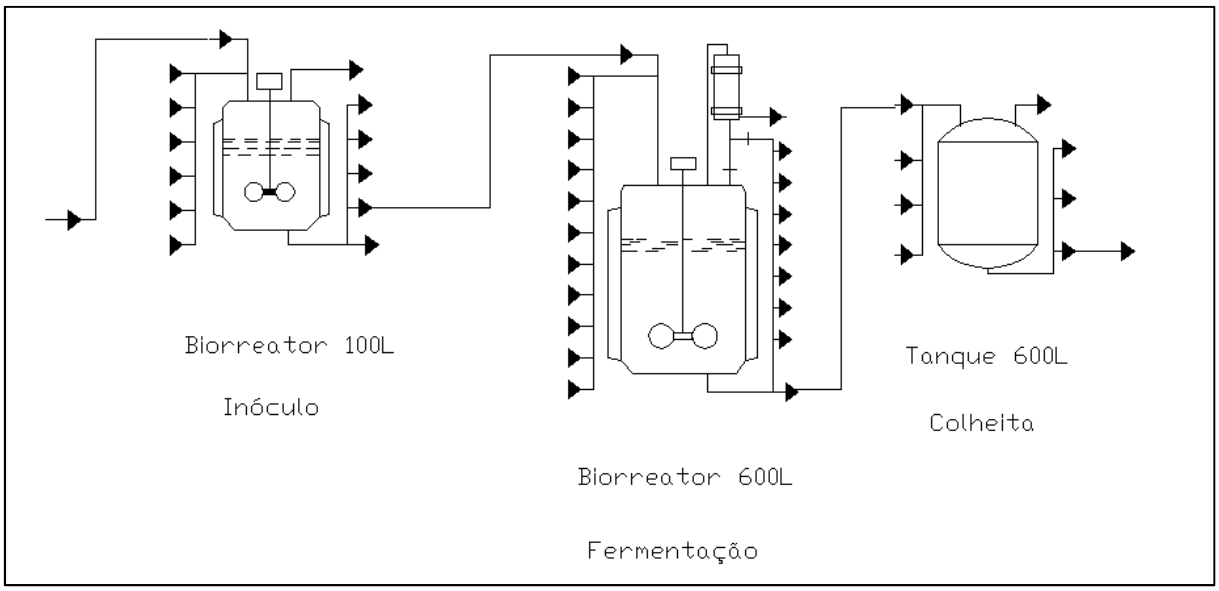
O oxigênio possui uma função essencial que permite a respiração celular e precisa ser fornecido e distribuído homogeneamente dentro do biorreator (LENCASTRE, 2011). O processo de biorreação acontece dentro de equipamentos identificados como biorreatores que se caracterizam por serem reatores químicos heterogêneos auto-catalíticos (NAUMAN, 2008). Entretanto, as diferenças em relação aos reatores químicos convencionais são amplamente significativas, por exemplo; a massa específica das células é apenas superior à do meio de cultura, a velocidade de crescimento dos microrganismos pode ser considerada rápida ou lenta, dependendo unicamente das propriedades do microrganismo, as dimensões das células bacterianas ou das proteínas de interesse são reduzidas.

Ao mesmo tempo, a mistura reagente é caracterizada por apresentar uma composição complexa, a transferência de massa é lenta, os microrganismos são amplamente sensíveis às condições ambientais, a composição do meio oscila, significativamente ao longo do tempo a causa da segregação de metabólitos e polímeros. Estas características têm forte influência na homogeneização do cultivo, na energia para a mistura, na transferência de massa gás-líquido e no controle do processo (PANGARKAR, 2014).

Da mesma forma que com reatores químicos convencionais, a estrutura dos biorreatores obedece aos mesmos princípios básicos de desenho, requerendo tanto das operações unitárias, como de balanços de massa e energia que derivem na construção da cinética de crescimento. Sendo assim, este sistema pode ser considerado como um candidato a ser avaliado utilizando ferramentas de análise de risco em cada operação unitária que o compõe.

Na Figura 3 é apresentado o sistema de biorreação incluindo os dois biorreatores de 100 e 600 L respectivamente e o tanque colheita com capacidade de 600 L que foram considerados como objeto de estudo para a realização deste trabalho.

Figura 3 - Sistema de Biorreação Bacteriana para produção de biomassa recombinante



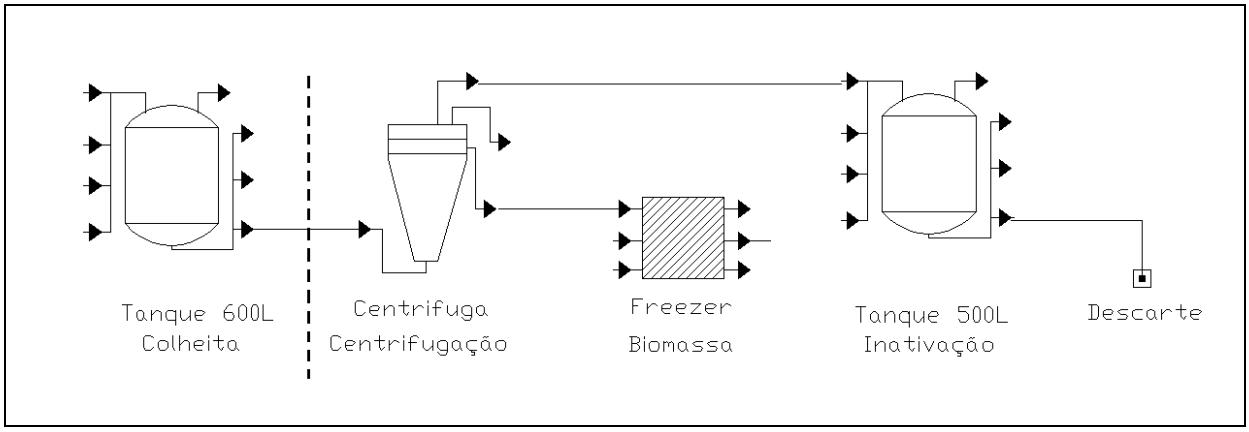
Fonte: Adaptado de SARTORIUS, 2009.

2.1.4 Etapa de Recuperação da Biomassa

A terceira etapa do processo para produção da biomassa recombinante é a centrifugação do cultivo de células (biomassa). Esta operação consiste na separação da biomassa produzida nos biorreatores do meio de cultura, utilizando uma centrífuga tubular de fluxo continuo para este fim. Este equipamento aproveita as propriedades físicas do produto (peso, densidade) e as do equipamento (aceleração, vazão) para atingir altos coeficientes de separação (LEUNG, 2007 e SPELTER; STEIWAND; NIRSCHL, 2010).

No processo analisado neste estudo de caso, a proteína de interesse é produzida intracelularmente (CARRIÓ et al., 2005), por este motivo a fase sólida (biomassa) é utilizada para dar continuidade ao processo produtivo em quando a fase líquida (sobrenadante) é inativada térmica ou quimicamente para posteriormente ser descartada em cumprimento com as legislações nacionais sobre Biossegurança na Lei Nacional 11.105/2005 e Boas Práticas de Fabricação – BPF descrita na Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA como RDC 17/2010 (BRASIL, 2010). Finalmente, a biomassa é congelada, para dar início a etapa de ruptura celular, lavagem e recuperação dos corpos de inclusão, este processo é mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Sistema de centrifugação e inativação de cultivo bacteriano.



Fonte: Adaptado de CEPA-SOLERI DO BRASIL, 2016.

2.1.5 Rompimento Celular

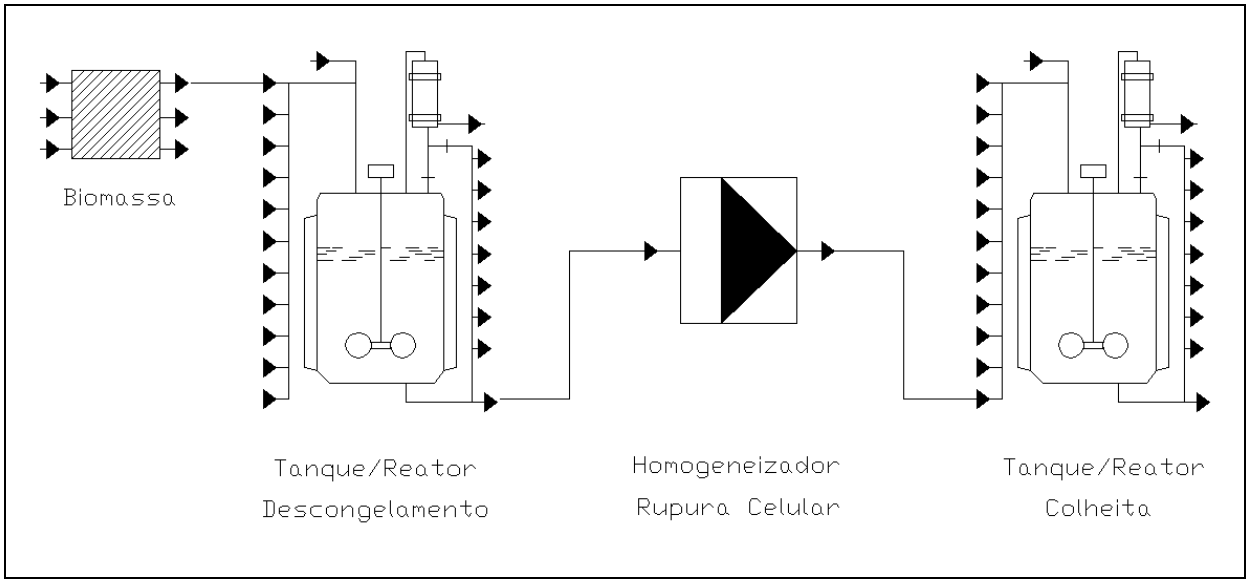
Esta etapa do processo é dividida em duas operações unitárias básicas, a homogeneização de alta pressão que é a operação responsável pelo rompimento celular, e a centrifugação que faz parte das operações de lavagem e recuperação dos corpos de inclusão (concentrado de proteínas de interesse) gerados dentro das células procarióticas utilizadas como plataforma produtiva (KESIK et al., 2004).

A homogeneização de alta pressão é uma prática comum em aplicações que precisam do rompimento celular(lise celular) permitindo que os componentes intracelulares sejam liberados (NAKIMBUGWE et al., 2006 e GOSCH et al., 2014), sem a utilização de solventes ou outros produtos químicos que enfraquecem a parede celular e podem degradar a proteína de interesse (HWANG; PAN; SYKES, 2014).A homogeneização a alta pressão é uma operação eficaz de ruptura da parede celular que frequentemente é utilizada para maximizar o rendimento das matérias-primas, permitindo simultaneamente manter a elevada qualidade do produto e evitando a utilização de agentes químicos que possam interferir com as características das proteínas.

Os homogeneizadores de alta pressão são equipados com válvulas especificamente concebidas e desenhadas para alcançar alta eficiência na ruptura das células em uma única etapa utilizando a pressão especifica de ruptura (DUBBELBOER et al., 2014). A alta pressão do homogeneizador é projetada para que os processos biotecnológicos cumpram os requisitos das operações utilizadas na obtenção de: Proteínas, Enzimas, Vitaminas, etc., por meio do rompimento de: vírus,

bactérias, algas ou leveduras (EKPENI et al., 2015). O sistema de ruptura celular analisado neste trabalho é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Sistema de Ruptura Celular por homogeneização de alta pressão.

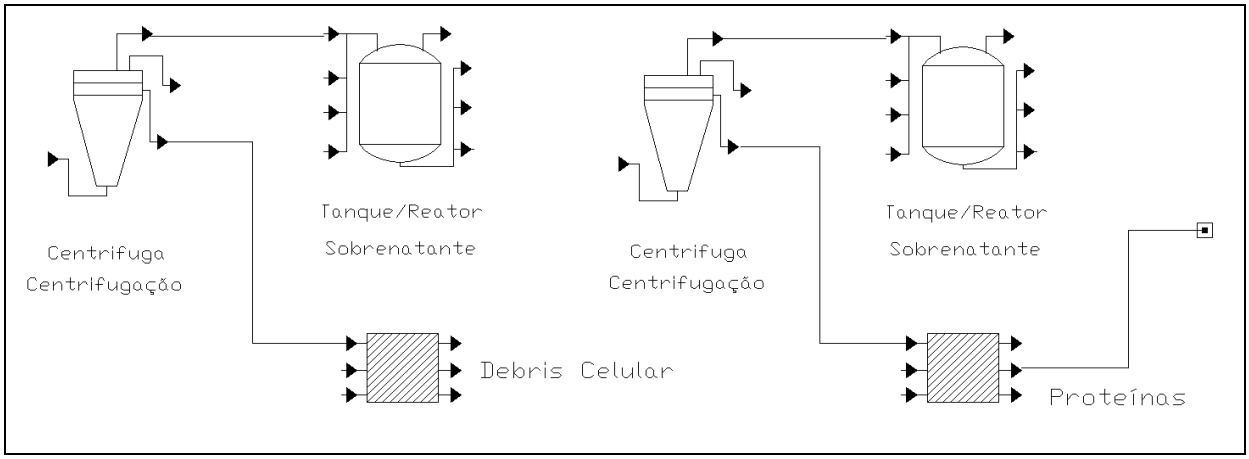


Fonte: Adaptado de GEA-NIRO SOAVI, 2013.

2.1.6 Lavagem dos Corpos de Inclusão

O processo de centrifugação para lavagem dos corpos de inclusão é similar com a centrifugação do cultivo, com a diferença que o volume processado é inferior que em operações previas (até vinte vezes menor). Na Figura 6 é apresentado o processo de lavagem e recuperação dos corpos de inclusão.

Figura 6 - Sistema de Centrifugação e Lavagem dos corpos de inclusão



Fonte: Adaptado de GEA NIRO SOAVI, CEPA-SOLERI DO BRASIL, 2013.

A lavagem dos corpos de inclusão é realizada em três estágios utilizando diferentes tampões, sendo em cada etapa efetuada a correspondente centrifugação para separação da fase sólida (corpos de inclusão) da líquida (sobrenadante) que será inativada em cada etapa.

Uma vez realizado este processo é possível dar como concluídas as operações da etapa a montante para geração de biomassa recombinante e recuperação de corpos de inclusão. Entretanto, como pode ser observado, em cada uma das etapas que compõem a geração de biomassa recombinante, existem inúmeras operações que são realizadas dentro dos equipamentos e que permitem a manipulação dos materiais utilizados no processo. Dentro da indústria, estas operações são comumente chamadas operações unitárias.

2.2 Operações unitárias nos processos produtivos

A indústria de processos é definida como um sistema de transformação de valores. O núcleo desta estrutura é o processo de produção, que combina a tecnologia, insumos (matéria prima) e serviços para obtenção de um produto final. A eficiência do processo de produção depende da razão entre a quantidade de matéria prima utilizada, o produto obtido em um determinado período de tempo e o desempenho dos equipamentos utilizados no processo (GARCÍA; VALLEJO; MORA, 2015). Por conseguinte, a eficiência aumenta quando um processo é capaz de produzir um maior volume na produção utilizando a mesma quantidade de insumos; ou quando é produzido o quantitativo esperado de produtos com menor quantidade de matérias primas (CHRYSSOLOURIS; PAPAKOSTAS; MAVRIKIOS, 2008).

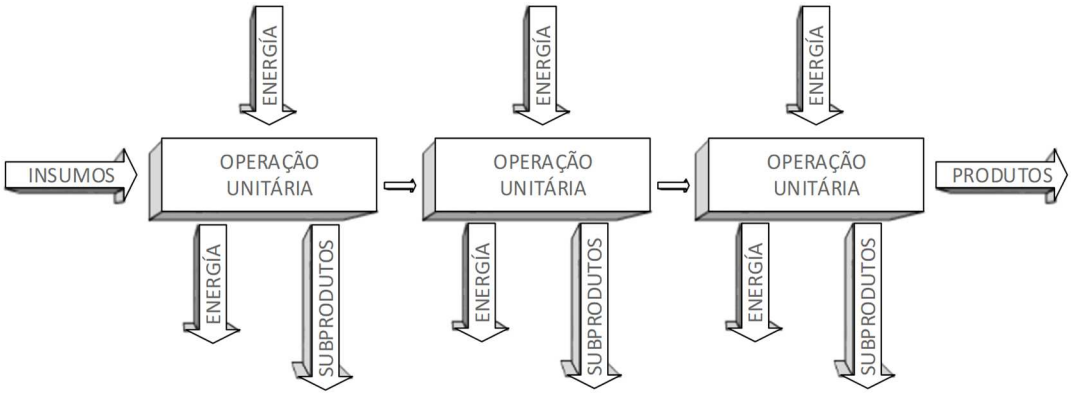
Sendo assim, uma forma eficaz de avaliar a eficiência produtiva de um processo é realizar uma análise do consumo específico dos diferentes elementos que o compõem, bem como, a capacidade otimizar as operações envolvidas no processo. É fato que o número de processos químicos, físicos e biológicos que são executados diariamente dentro da indústria é quase infinito (LOYD; POPOVICH; ANSEL, 2011), sendo praticamente impossível estudá-los e analisa-los se não existisse um ponto de convergência entre todos eles. A possível conexão entre esses processos pode ser explicada através do conceito da transformação de matérias primas em produtos. Esta tarefa é executada por meio do uso de uma série de operações físicas e químicas que, em alguns casos, são específicas para cada processo, mas, de forma geral são

operações comuns ou similares dentro da indústria (JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2011). Montoya et al. (2006) propõem que o procedimento de transformação dos materiais num produto dentro da indústria produtora de bens segue um processo definido que é dividido na seguinte sequência:

1. Disponibilização das Matérias Primas
2. Utilização de Operações Físicas de Acondicionamento
3. Reações Químicas ou Atividade Metabólica (segundo o caso)
4. Operações Físicas de Separação
5. Obtenção e preparo dos Produtos

Portanto, o processo produtivo pode ser finalmente definido como um conjunto de operações unitárias ordenadas, que em conjunto com a aplicação de uma fonte de energia são estruturadas até atingir um objetivo ou gerar um produto (GROEP et al., 2000). Na Figura 7 é apresentado um processo típico de transformação de matérias primas em produtos através da utilização de operações unitárias e energia.

Figura 7 - Fluxograma de um processo convencional que transforma uma determinada matéria-prima em um produto final utilizando operações unitárias e energia.



Fonte: Adaptado de ANASTAS, 1984.

Para classificação das operações unitárias dentro da indústria, a propriedade de transformação é priorizada, segundo Harmsen (2013) a hierarquização das operações pode ser dividida em:

a) Operações unitárias físicas:

As operações unitárias físicas são responsáveis pela transformação da matéria prima (sem existir reação química), aproveitando os efeitos de fenômenos físicos. Na Tabela 1 são apresentadas as principais operações unitárias físicas bem como os principais equipamentos utilizados para esse fim.

b) Operações unitárias químicas-biológicas

Estas operações têm como objetivo a manipulação de insumos para um produto, comumente este processo pode ser resumido com o princípio de transformação de reativos em produtos (HACKER et al., 2009 e SWIECH; PICANÇO-CASTRO; COVAS, 2012). Esta operação é característica dos reatores no caso da indústria química convencional, no entanto, dentro da indústria biofarmacêutica esta tarefa é efetuada dentro de fermentadores ou biorreatores (GARCÍA-FRUITO'S et al., 2012).

Tabela 1 – Exemplo de operações unitárias físicas mais utilizadas dentro da indústria de processos.

Transferência de Massa	**Transferência de Calor**	**Transferência simultânea de calor e de massa**	**Transferência de Fluídos**	**Separação**	**Operações físicas complementares**
Absorção	Troca de calor	Cristalização	Compressão	Filtração	Trituração
Destilação	Aquecimento (Fornos)	Secagem	Bombeamento	Sedimentação	Moagem
Extração	Refrigeração	Liofilização	Fluidização e transporte pneumático	Classificação hidráulica	Peneiração
Adsorção	Evaporação	Coluna de resfriamento		Flutuação	Mistura
Troca iônica	Condensação			Centrifugação	Armazenagem de materiais
	Acumuladores de Calor			Osmose inversa	
	Transformação de calor (Painel Solar)				

Fonte: TAIT, 2011.

Na indústria biofarmacêutica, as operações unitárias utilizadas no processo produtivo, são consideradas como operações que favorecem as condições necessárias para que o microrganismo (utilizado como plataforma produtiva) realizeas suas funções metabólicas, e assim, transformar nutrientes em produtos (proteínas). Para que um determinado microrganismo tenha a capacidade de transformar esses

nutrientes, as operações unitárias envolvidas no processo devem de atender os parâmetros e condições específicos para cada processo.

Estes processos de transformação podem ser classificados em três etapas:

- Modificação de massa ou composição
- Modificação do nível ou quantitativo de energia
- Modificando as condições de movimento (velocidade, vazão, etc.)

De igual forma que num processo químico convencional, a produção de biomassa recombinante, precisa da harmonização de dois componentes chave; os *processos:* onde um conjunto de procedimentos e técnicas que por meio de operações unitárias favorecem a transformação dos insumos em produtos finais; e os*equipamentos:* que conformam a infraestrutura onde as operações unitárias de processo são executadas, permitindo assim a transformação de materiais em insumos (NASSERI et al, 2011).

Esta divisão favorece a identificação e caracterização das operações unitárias durante o desenho de um processo, estabelecendo que em todo caso um processo requer de operações unitárias que permitam a transformação da matéria em produtos, além de precisar da infraestrutura que permita a execução das operações unitárias necessárias (TROUP, 2013). Portanto, foi identificada a necessidade de avaliar estes aspectos por separado (processo e infraestrutura), facilitando assim, o processo de aplicação de ferramentas de análise de risco. Para garantir que um sistema foi construído para satisfazer as necessidades do processo é necessário seguir ir as seguintes premissas:

- Verificar que o fluxo dos reagentes seja completo, até conseguir as propriedades e características desejadas.
- Proporcionar o tempo de contato necessário entre os elementos dentro dos equipamentos (fermentadores, centrífugas, tanques e outros) até atingir parâmetros de operação.
- Satisfazer condições de pressão, temperatura e composição (parâmetros de processo), de modo que as operações aconteçam segundo planejado, considerando em todo momento os aspectos termodinâmicos e cinéticos.

2.2.1 Operações Unitárias em sistemas de produção de biomassa recombinantes

O procedimento em que uma operação unitária na indústria biofarmacêutica desempenha sua função, não é diferente que na indústria química *tradicional*. A principal diferença radica nas particularidades das operações de produção e não na função da operação unitária. Em ambas as indústrias, estas operações se repetem ao longo das etapas dos processos, sofrendo pequenas variações nos parâmetros de operação ou na finalidade segundo o caso. Portanto, as operações unitárias envolvidas nos processos devem de ser profundamente caracterizadas e bem compreendidas, almejando o entendimento dos impactos durante operação. Desta forma, a seguir são apresentadas as operações unitárias mais comumente utilizadas nos processos biotecnológicos, e no Anexo II são apresentadas as equações características destas operações:

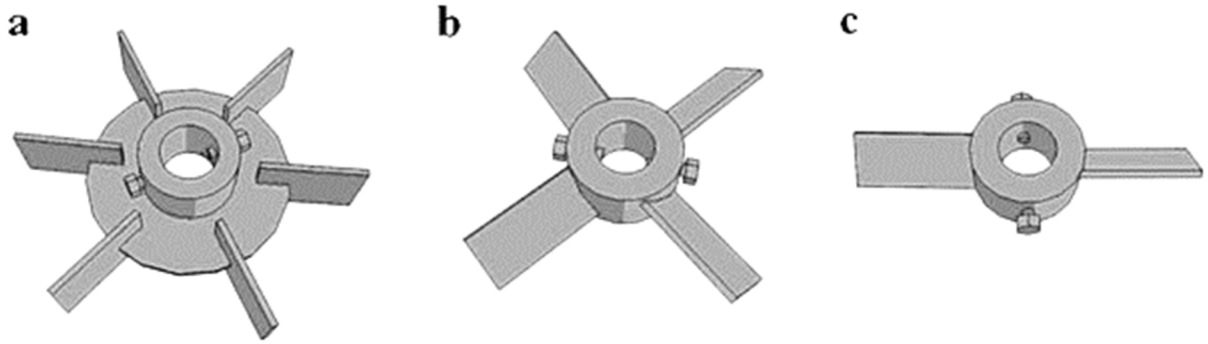
I. Agitação

Esta operação unitária é utilizada em diversas etapas do processo produtivo de biomassa recombinante, e comumente serve como suporte para que outras operações unitárias possam ser executadas com sucesso (HEWITT et al., 1998). Dentro dos processos em que esta operação é utilizada, destacam-se a suspensão de partículas sólidas, mistura de líquidos miscíveis (dispersão de um gás através de um líquido), dispersão de líquido imiscível em um outro para formar emulsões a suspensão de gotas finas, promoção da transferência de calor entre um líquido e um sistema de controle de temperatura (serpentina ou camisa de um tanque).

O conhecimento técnico cientifico atual, tem caracterizado profundamente o processo de agitação permitindo estabelecer as equações e parâmetros necessários para o cálculo de um sistema de agitação dentro de tanques (Anexo II).

Na Figura 8, são apresentados diversos tipos de pás utilizados para promover a agitação. Estes sistemas de agitação são comumente compostos de pás e amplamente utilizado como sistema de agitação e mistura nos biorreatores, tanques de inativação de cultivos, tanques de processo para resuspensão de sólidos e para promover a troca termia entre as paredes de um tanque encamisado e o liquido dentro deste.

Figura 8 – Tipos de impelidores utilizados comumente para otimizar a agitação em biorreatores.



Legenda: a) Impelidor Rushton convencional vertical (6 pás); b) Impelidor axial (4 pás); c) Impelidor axial (2 pás)

Fonte: KARIMI et al., 2013.

II. Bombeamento

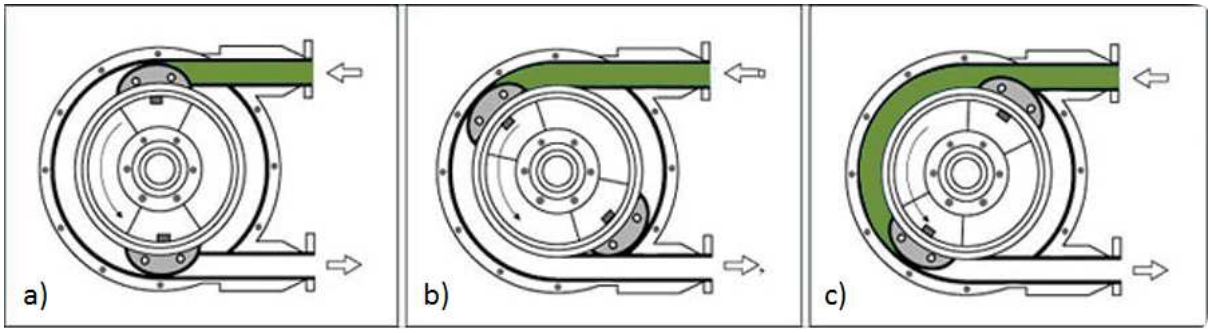
Uma das operações mais utilizadas no processo de produção de biomassa recombinante é o bombeamento de fluidos para transferência de produtos e soluções necessárias ao longo do processo.

O bombeamento peristáltico é o tipo de bombeamento mais utilizado no processo de produção de biomassa recombinante devido à capacidade de evitar o contato do produto com os mecanismos de bombeamento. Portanto, estes dispositivos são utilizados em repetidas ocasiões e são considerados como elementos críticos do processo.

Estes sistemas incluem uma tubulação flexível (mangueira) que é comprimida por uma sucessão de rolos móveis que capturam o líquido (que nos processos biotecnológicos tem parâmetros de densidade e viscosidade similares aos da água) e cria o movimento ao longo da tubulação com uma vazão praticamente constante. A análise desta operação unitária permite perceber que a variabilidade na vazão teórica do sistema, gera impactos diretos no rendimento do processo.

Na Figura 9 é mostrada o funcionamento de uma bomba peristáltica utilizada no processo.

Figura 9 - Funcionamento de uma bomba peristáltica.



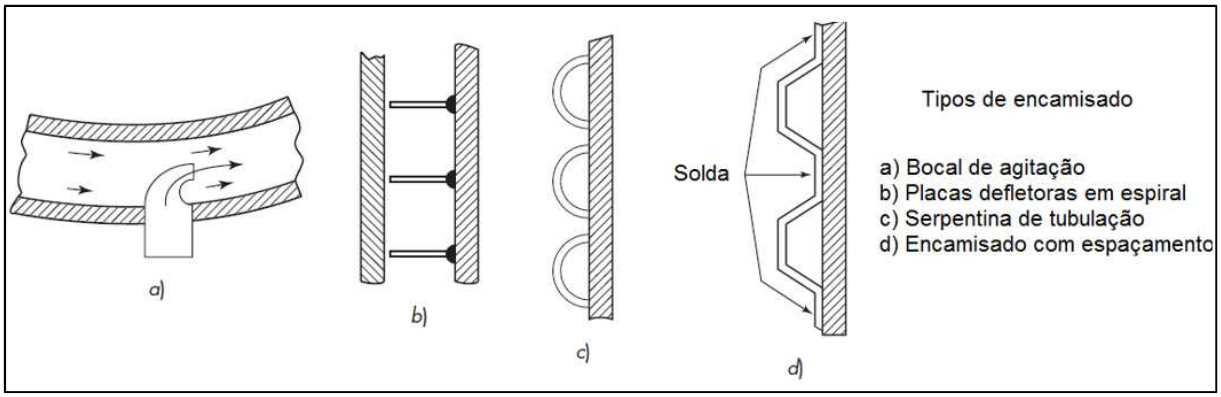
Legenda:a) líquido passa através de uma tubulação flexível. b) O líquido fica entre os rolos moveis. c) O movimento dos rolos cria vazão de líquido.

Fonte: PERISTALTIC PUMPS.

III. Transferência de calor em tanques de processo

Para satisfazer as necessidades do processo, o controle da temperatura durante a produção de biomassa recombinante é fundamental em função da característica dos micro-organismos (DEBAB et al., 2011). Sendo assim, para manter o produto de interesse na faixa de temperatura estabelecida nos protocolos de operação são utilizadas camisas para aquecimento ou resfriamento. Na Figura 10 são mostrados os desenhos comumente utilizados para aquecimento/resfriamento de tanques agitados.

Figura 10 - Tipos de desenhos de camisa para tanques com controle de temperatura.

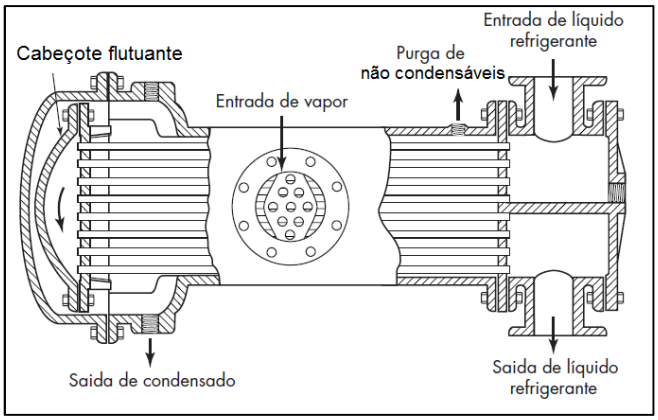


Fonte: McCABE et al., 2005.

IV. Condensação

Sempre que sobre uma superfície fria há o contato de um vapor saturado ocorre condensação, desde que a temperatura da superfície seja inferior a temperatura de saturação. O uso de condensadores na produção de biomassa recombinante pode ser considerado exclusivo para os processos onde é realizado o processo de biorreação (como exemplo a plataforma procariótica). A condensação de gases de exaustão dos biorreatores se justifica ante a necessidade de cumprir com duas funções básicas: primeiramente a condensação permite a recuperação de pequenas partículas de cultivo que poderiam estar presentes dentro dos gases de exaustão em forma de vapor (McNEIL; HARVEY, 2008); a segunda função tem como objetivo satisfazer os quesitos regulatórios que estabelecem parâmetros térmicos específicos dos gases de exaustão (BRASIL, 2010). Na Figura 11 é representado o modelo padrão de um condensador utilizado nos sistemas fermentativos de produção de biomassa recombinante.

Figura 11 - Condensador de dois passos utilizado para recuperação de líquidos e controle de temperatura dos gases de exaustão de um sistema de fermentação.



Fonte: McCABE et al., 2005.

O funcionamento básico de um condensador pode ser explicado da seguinte forma: um fluido ou gás quente, com uma temperatura T_{ha}, deve ter a sua temperatura reduzida na saída do equipamento definida por T_{hb}, isto acontece quando um fluido refrigerante entra no equipamento com uma temperatura inicial T_{ca}, e após terminar a troca de calor na saída do equipamento (absorve temperatura do outro líquido)

aumenta a sua temperatura até T_{cb}, sendo esta temperatura superior à temperatura de entrada.

V. Adsorção

A adsorção de oxigênio (O_2) que acontece dentro do processo especifico da biorreação para geração de biomassa recombinante, não segue o comportamento estabelecido pelas operações unitárias de adsorção de gases convencionais. Uma vez, que os micro-organismos (ROSANO; CECCARELLI, 2014), utilizam o oxigênio dissolvido no meio para o crescimento celular e para as funções metabólicas do micro-organismo.

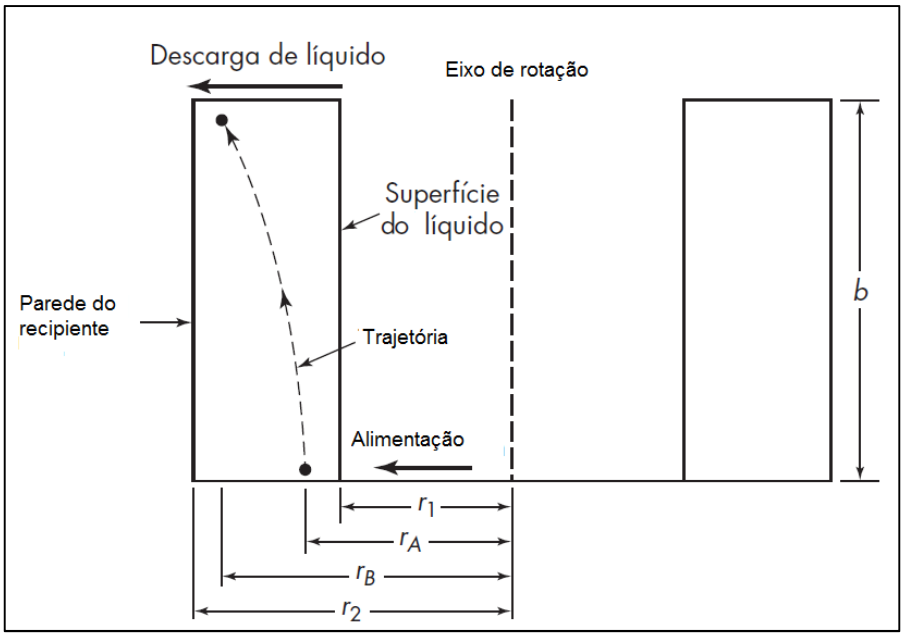
No entanto, ainda que este fenômeno não siga um comportamento físico-químico de operação unitária convencional dentro da biorreação, a eficiência da operação de adsorção de oxigênio depende da velocidade de respiração (**k_La**), que a sua vez é uma função que depende diretamente do desenho do fermentador, agitação para melhorar a distribuição de oxigênio no tanque (fermentador) e da concentração celular. Portanto, mantendo estes parâmetros sob controle é possível aumentar a eficiência de respiração para efetuar as funções do metabolismo do microrganismo. Mediante a equação da velocidade específica de respiração apresentada no Anexo II, é possível determinar a taxa de crescimento bacteriano dentro de um biorreator e, posteriormente, identificar as causas de possível desvios no crescimento esperado ao longo de um processo.

VI. Centrifugação (Sedimentação)

No processo produtivo da biomassa recombinante esta operação unitária é utilizada em várias etapas devido a sua capacidade de separar sólidos (biomassa e proteínas) de tamanhos definidos de um líquido (meio e soluções) no qual se encontram imersas. Nesta separação, as partículas se movimentam radialmente até chegar ou acumular na parede do recipiente do separador (rotor) (McCABE et al., 2005). Na Figura 12 mostra-se o perfil da trajetória que as partículas seguem dentro do dispositivo de centrifugação durante o processo de separação, onde b = altura do recipiente ou rotor, r_A= início do acumulo de partículas no fundo, r_B = acúmulo de

partículas no final do tempo de processo, r_1 = raio da capa líquida e r_2 = raio da parede do equipamento.

Figura 12 - Trajetória de uma partícula dentro de um dispositivo de sedimentação por centrifugação.



Fonte: McCABE et al., 2005.

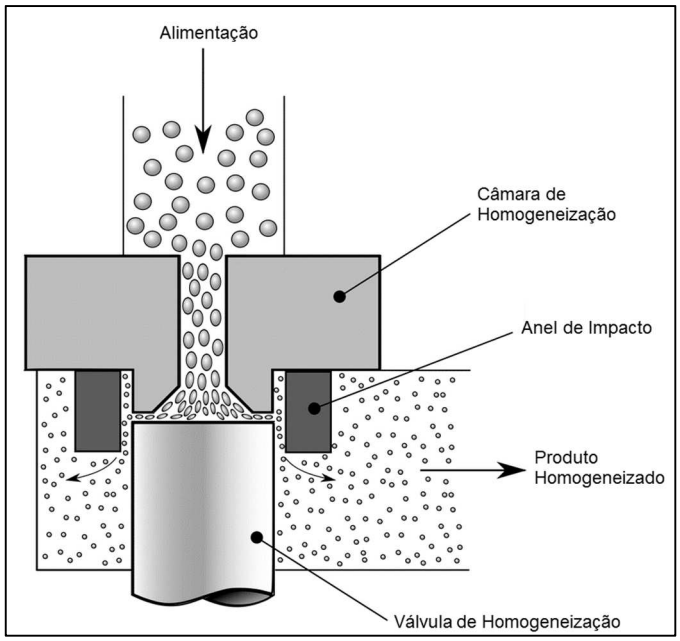
Portanto, a eficiência e bom desempenho desta operação pode ser interpretado como a maior quantidade de partículas acumuladas na parede do recipiente num tempo determinado

VII. Compressão (homogeneização de alta pressão)

A operação de ruptura celular utilizada no processo de produção de biomassa recombinante é uma etapa fundamental necessária para a recuperação do produto de interesse. Uma vez que as proteínas de interesse se encontram no interior da célula na forma de corpos de inclusão, a ruptura de uma célula resulta na exposição do produto e facilita as etapas subsequentes de purificação. Em consequência, procura-se atingir altos níveis de eficiência de ruptura, e desta forma, baixos níveis de células viáveis (células não rompidas).

Na Figura 13, é representado o funcionamento do equipamento de homogeneização de alta pressão utilizado no processo.

Figura 13 - Diagrama do funcionamento de um homogeneizador de alta pressão para rompimento de células recombinantes.



Fonte: DHANKHAR, 2014.

VIII. Filtração (Ar de Processo e Recuperação de Aerossóis)

O ar é uma mistura de gases compostos por aproximadamente 21% de oxigênio (O_2), 78% de nitrogênio (N_2), 1% de argônio (Ar) e em pequenas quantidades outros gases. A mistura, também inclui material particulado e poluentes químicos gerados durante as operações dos processos industriais. Nos sistemas de ventilação e ar condicionado, o termo "filtração" é definido como a redução do conteúdo de partículas sólidas indesejáveis, ou contaminantes químicos contidos no ar, que é conseguido pela passagem forçada de ar através de um meio ou elemento de filtro.

Para atingir este objetivo, aspectos importantes devem de ser considerados na especificação do tipo de filtro a ser utilizado. Dentro os mais importantes podemos considerar:

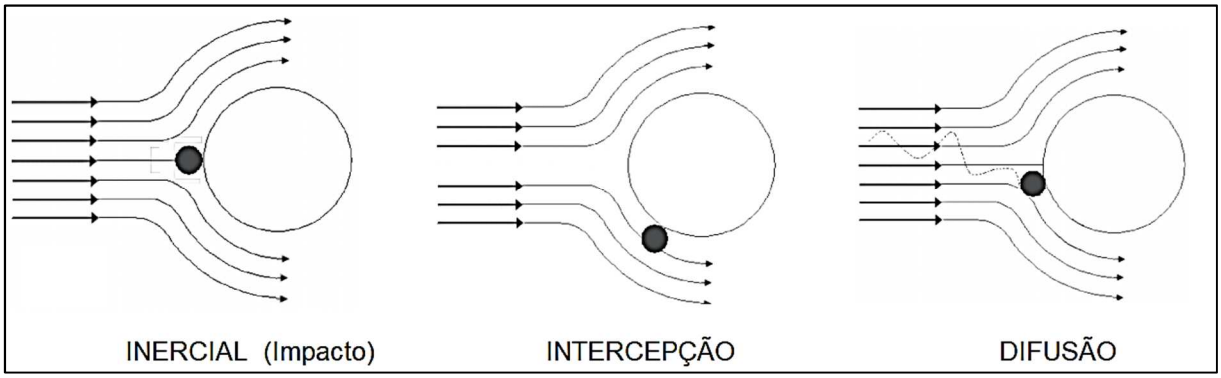
1. Eficiência de filtração: Definida como a relação entre a quantidade de partículas sólidas capturadas pelo meio filtrante, e a concentração destas partículas presentes

no ar antes do processo de filtração. Esta relação é utiliza para medir a capacidade de remoção de material particulado do fluxo de ar (interceptabilidade).

2. Resistência ao fluxo de ar: Definido como a diferença de pressão antes e depois do filtro, é uma propriedade do meio filtrante (filtro limpo) para resistir o fluxo de ar que o atravessa.

3. Capacidade de retenção de partículas: É definida como uma medida da capacidade máxima do meio de filtragem para reter partículas do fluxo de ar que passa através dele, antes de precisar sua substituição ou limpeza, desde o início até o final da operação. Na Figura 14 são apresentados os mecanismos de filtração mais utilizados dentro da indústria, conhecidos como Inercial, Intercepção e Difusional.

Figura 14 - Mecanismos de Filtração.



Fonte:Adaptado de NAFA, 2014.

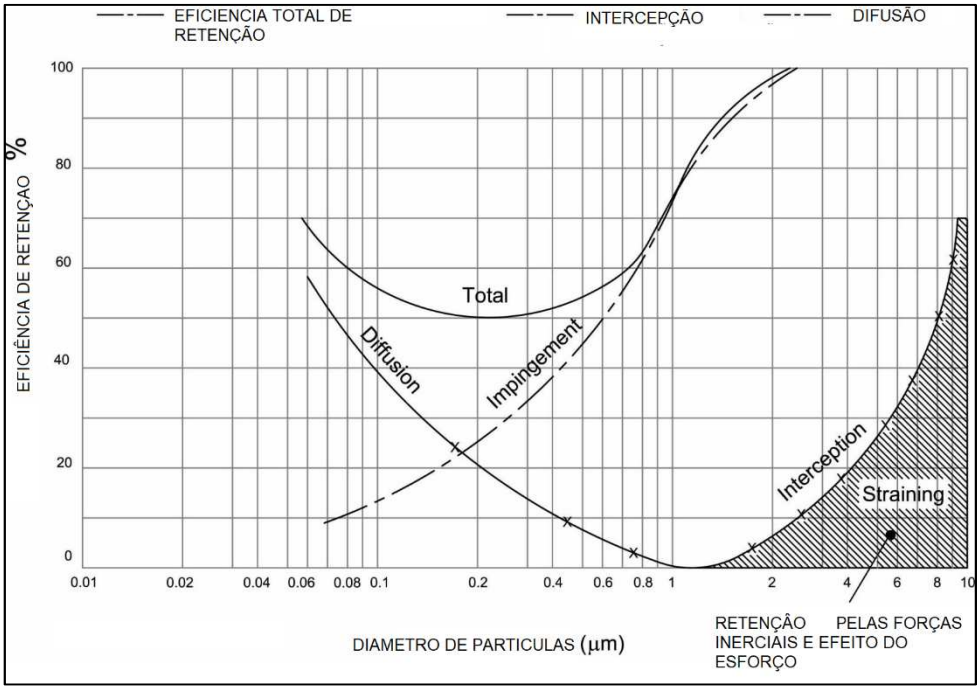
Inercial. É o mecanismo pelo qual as partículas de grande tamanho (entre 5 e 15 mícrones) são capturadas. À medida que o ar carregado de partículas passa através do meio filtrante, o ar procura uma rota entre as fibras do filtro. Devido à inércia, as partículas não seguem as linhas aerodinâmicas do ar ao redor das fibras. Em vez disso, se movimentam em linha reta até atingir as fibras do filtro, aderindo a elas.

Interceptação. Ocorre quando uma partícula de poeira (entre 0,001 e 5 mícrones) segue as linhas aerodinâmicas do ar, mas ainda viaja para entrar em contato com as fibras, elas passam por essas linhas. Se as forças de atração entre a fibra e as partículas fossem mais fortes do que a tendência do fluxo de ar para desalojá-las, a partícula será removida da corrente de ar.

Efeito difusional. Explica a retenção de partículas muito pequenas (tamanho inferior a 01 mícron). O ar carregado de partículas consideradas pequenas ao passar pelo meio filtrante não adquire a trajetória das correntes aerodinâmicas do ar. Em vez disso, são

bombardeados por moléculas de ar (gás), o que faz com que sigam um caminho errático descrito como movimento browniano. Essa trajetória errática aumenta a probabilidade de as partículas entrarem em contato com as fibras e permanecerem ligadas a elas, ou seja, são capturadas. A Figura 15 mostra a capacidade de filtragem dos três principais efeitos de filtragem (difusão, intercepção e inércia).

Figura 15 - Avaliação da eficiência de retenção de partículas em filtro para ar.



Fonte: Adaptado de ASHRAE, 1989.

Como pode ser percebido, é sumamente importante garantir que todas as operações unitárias apresentadas anteriormente sejam realizadas de forma correta e concisa ao longo do processo. É desta forma que a qualificação dos equipamentos e sistemas oferece uma comprovação com fundamentos técnicos para assegurar este objetivo.

2.3 Qualificação de Equipamentos

Dentro da indústria farmacêutica convencional, comumente são adquiridos equipamentos de desenho padrão ou estandarizados, nos quais não existe a necessidade de projetar componentes específicos para o correto funcionamento do sistema. Entretanto, a aquisição de equipamentos customizados em vários dos seus

componentes para atender as demandas especificas do usuário durante o estabelecimento da infraestrutura para o desenvolvimento dos processos, tem sido uma prática que permite incorporar rapidamente processos considerados de alta complexidade.

Sendo assim, atualmente dentro da indústria geradora de produtos biotecnológicos, a infraestrutura em grande parte deve ser desenhada para satisfazer as necessidades particulares do processo. Em consequência, o volume de recursos humanos e financeiros para realizar as atividades de comissionamento e qualificação da infraestrutura, e para a verificação dos equipamentos responsáveis pela realização do processo, são muito superiores aos recursos necessários para cumprir as mesmas tarefas dentro da indústria farmacêutica convencional.

Estes gastos podem chegar a ser excessivos, e as vezes redundantes, uma vez que em alguns casos pode ser necessário realizar novas validações, que geralmente são oriundas da adequação e readequação dos equipamentos dentro da área produtiva, para satisfazer novos quesitos regulatórios em função da atualização de legislação sanitária. Outro grande desafio apresentado durante o processo de desenho de um sistema, é o atendimento das necessidades especificas de diferentes usuários. Essa situação pode facilmente conduzir a diferentes abordagens durante a qualificação do equipamento e gerar pacotes de documentação e folhas de dados que precisariam de uma análise mais minuciosa, dificultando assim o processo de qualificação.

Por tanto, uma abordagem baseada em risco para definição de parâmetros e pontos específicos para análise do processo de qualificação, pode resultar em uma economia significativa de tempo e esforço, racionalizar atividades, manter o processo sob controle e trazendo desta forma benefícios consideráveis para a instituição, diminuindo custos com reprocesso e reprovações. A Associação Internacional de Engenharia Farmacêutica – ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering) sugere esta abordagem e recentemente passou a ser extensivamente mais utilizada na indústria (ISPE, 2005).

2.3.1 Definição e objetivo da qualificação

O processo de qualificação deve incluir o planejamento, verificação e documentação de todos os testes tecnicamente relevantes que são aplicados para

demostrar que os equipamentos e sistemas operam de acordo com as especificações predefinidas.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2010), a qualificação é um conjunto de ações realizadas para atestar e documentar que quaisquer instalações, sistemas e equipamentos estão propriamente instalados e/ou funcionam corretamente e levam aos resultados esperados. A qualificação de equipamentos é frequentemente uma parte da validação, mas as etapas individuais de qualificação não constituem, sozinhas, uma validação de processo.

O objetivo e alcance da qualificação é estabelecido em função de uma análise de risco e deve ser baseado na Especificação Requerimentos do Usuário (ERU). As atividades devem de ser realizadas previamente à realização da validação do processo para demostrar que todos os equipamentos utilizados durante o processo cumprem satisfatoriamente com a sua função esperada.

2.3.2 Tipos de Qualificação

Durante o ciclo de vida de um produto, existem diferentes processos de qualificação de equipamentos que devem ser aplicados nas diferentes etapas do processo, considerando premissas e elementos que serão submetidos a testes segundo for necessário (RAMASUBRAMANIYAN et al., 2013).

a) *Qualificação de Desenho (QD);* é uma verificação documentada que avalia se o desenho preliminar dos equipamentos é consistente para efetuar a operação desejada dos equipamentos, de acordo com as normas das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Frequentemente, a verificação do desenho consiste na verificação dos requerimentos de usuário (ERU) do equipamento ou sistema sob qualificação, e verifica se estes cumprem com a solução proposta e documentada através das especificações técnicas e/ou funcionais. Esta verificação comumente pode incluir os testes de qualificação da instalação.
b) *Qualificação da Instalação (QI);* o objetivo da qualificação da instalação é verificar e documentar que todos os componentes do sistema a ser qualificado foram instalados corretamente conforme desenho, também estabelece que toda a documentação técnica está disponível e é adequada para satisfazer as

necessidades da instalação, além de cumprir com os requerimentos do usuário definidos para esta instalação.

c) *Qualificação de Operação (QO);* durante a qualificação da operação são documentados os ensaios e testes que permitem garantir que todas as partes que compõem o sistema ou equipamento do processo, funcionam adequadamente e seguem os parâmetros de operação dentro das especificações definidas. Como pré-requisito para a execução do protocolo de qualificação da operação deve-se verificar que na qualificação da instalação não existam desvios nem riscos considerados como críticos.

d) *Qualificação de Desempenho (QP);* o objetivo desta etapa de qualificação consiste na verificação que uma operação funciona segundo os requerimentos estabelecidos pelo usuário e que os ciclos de operação são homogêneos e facilmente reproduzíveis ao longo do tempo. Também verifica o correto funcionamento do sistema dentro da rotina. Os testes de qualificação de desempenho são normalmente integrados com os testes da qualificação de operação, ou como parte da validação do sistema. A qualificação de desempenho pode ser considerada como a própria validação do processo.

A análise de risco utilizada como ferramenta para qualificação de equipamentos pode ser significativamente reforçada com o apoio das informações técnicas dos fornecedores, uma vez que eles possuem um profundo conhecimento dos sistemas que estão fornecendo. Esta abordagem permite garantir de forma mais rápida, econômica, e mais completa, resultados fiáveis. Com isso, o processo de comissionamento e qualificação pode ser simplificado, principalmente quando o envolvimento do fornecedor dos equipamentos de processo acontece nas diferentes etapas deste complexo processo, assim o conhecimento gerado durante o desenvolvimento do equipamento e subsequente processo de fabricação interagem para um propósito final, que sempre tem como função primordial a segurança do produto aos consumidores.

2.4 Gestão de Risco na Industria Biofarmacêutica

A existência de um sistema para autorização para comercialização de produtos farmacêuticos garante que os medicamentos sejam avaliados por uma autoridade

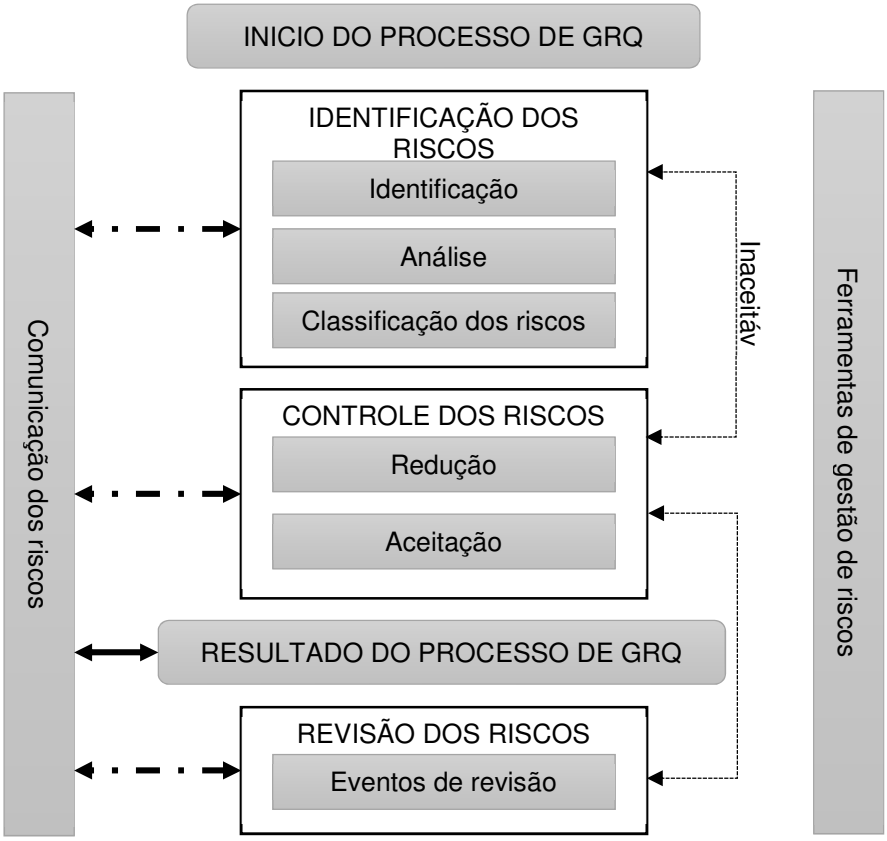
regulatória competente para assegurar o cumprimento dos requisitos relativos à segurança, qualidade e eficácia dos produtos (CALIXTO, 2000). Neste cenário é papel da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) inspecionar as instalações produtivas onde os produtos farmacêuticos são manufaturados (BRASIL, 2009).

A Agência tem também a tarefa de estabelecer os parâmetros de qualidade para que os produtos gerados tenham o mesmo padrão de qualidade dos produtos gerados em outros países (BRASIL, 2010), permitindo, desta forma, que produtos locais se tornem competitivos no mundo globalizado (IFPMA, 2011). Desta forma a internacionalização do mercado farmacêutico impôs a indústria farmacêutica a necessidade de uma racionalização e harmonização da regulamentação da introdução no mercado de novos medicamentos, com o objetivo de reduzir os custos na saúde e permitir uma melhor acessibilidade dos doentes aos novos produtos (TRIEBNIGG, 2008).

Para o Conselho Internacional de Harmonização através do seu Guia ICH Q9 a aplicação da gestão do risco a qualidade dentro da indústria farmacêutica, significa agir de forma proativa, preventiva, preditiva e previsível (ICH Q9, 2005). A gestão de risco a qualidade vem ao encontro a essas iniciativas e pode ser vista como um processo de concepção e execução de produtos e serviços de forma eficaz, eficiente e econômica, de forma que os riscos possam ser identificados, caracterizados priorizados e mitigados (WESTGARD, 2013).O gerenciamento de riscos requer uma continua avaliação do potencial de riscos na estrutura da organização em todos os níveis hierárquicos e busca agregar os resultados no nível corporativo, estabelecendo prioridades e melhorando a tomada de decisões (NOHARA; ACEVEDO; VILA, 2005). Uma vez que os riscos são inerentes às diferentes operações dos processos de transformação de matéria prima em produtos finais (DORAN, 2012), é fundamental conhecer o potencial desses riscos e os impactos que poderiam gerar nos processos e produtos, seja analisando, sob a ótica de análise dos riscos, profundamente os equipamentos dos processos ou mesmo as áreas produtivas.

Desta forma o objetivo principal do Gerenciamento de Riscos é o de avaliar e aumentar a probabilidade e o impacto dos eventos positivos e reduzir a probabilidade e o impacto dos eventos negativos (PROAG, 2014). Gerenciamento de Riscos a Qualidade é um processo sistemático para avaliação, controle, revisão dos riscos de qualidade de um medicamento durante o ciclo de vida do produto, representado na Figura 16.

Figura 16 - Estrutura geral do processo de Gestão de Risco para Qualidade (GRQ).



Fonte: Adaptado de ICH Q9, 2005.

Neste contexto, existem várias ferramentas de Análise de Riscos que poderão ser adotadas para definição dos riscos voltados as operações unitárias envolvidas em um processo produtivo da indústria biofarmacêutica (LOTLIKAR, 2013).

O correto desempenho das operações produtivas tais como: uso das instalações, fluxo de processo, desenho de equipamentos, materiais e pessoas para geração de bens, depende da consideração de falhas que podem ser antecipadamente identificados e simulados.

Na atualidade existem diversos trabalhos que fazem referência à gestão de riscos para a indústria farmacêutica, não obstante, os trabalhos realizados para qualificação de equipamentos para produção farmacêutica (sintética ou biotecnológica) baseada em riscos são limitados, uma vez que analisam de forma geral as macro-operações, tornando necessário utilizar mais de uma ferramenta ou outra metodologia para complementar a avaliação de riscos. Visto que existe um imenso número de trabalhos que utilizam ferramentas de análise de risco na indústria farmacêutica, é possível destacar os seguintes exemplos que avaliam os riscos potenciais em equipamentos análogos entre a indústria farmacêutica convencional e

biotecnológica. No estudo realizado por Gayard (2009) é aplicada a ferramenta de análise de risco HACCP - Análise de risco e pontos críticos de controle (Hazard Analysis and Critical Control Points) assim como ferramentas estatísticas para avaliação da capabilidade (medida que uma máquina vai se desgastando) em autoclaves seguindo as diretrizes do Guia Q9 do ICH.

Em um trabalho similar, Maranhas (2007), estudou o processo de qualificação de duas lavadoras (a primeira utilizada para lavagem asséptica de vidaria e a segunda para materiais em geral), utilizando primeiramente o Processo Analítico Hierárquico (Analytic Hierarchy Process – AHP), esta ferramenta estrutura problemas e ajuda a definir os objetivos, critérios e alternativas para resolver as situações críticas que foram identificadas em um sistema (lavadora) e posteriormente utiliza a Análise do Modo e Efeito de Falha (Failure Mode, Effects Analysis- FMEA), para avaliação dos riscos inerentes à seleção de uma sustância marcadora para mensurar a eficiência do processo de lavagem. De igual forma, a ferramenta FMEA é utilizada por Van Leeuwen et al. (2009), como um elemento essencial para validação analítica de processos de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) aplicada para detecção de drogas seguindo como modelo as diretrizes de aplicação da ferramenta estabelecidas no Guia ICH Q9.

Finalmente, Bixio et al. (2002) aplicaram uma ferramenta de análise comumente utilizada no gerenciamento de riscos conhecida como o Método Monte Carlo, que consiste em um método quantitativo para o desenvolvimento da análise de risco. Este método é aplicado em um biorreator desenhado para tratamento de efluentes líquidos de descarte para analisar o impacto e risco unicamente na eficiência do processo (não avalia o risco em equipamentos) quando as condições de operação são alteradas. Já a ferramenta de Análise Preliminar de Perigos (Preliminar Hazard Analisys – PHA) tem sido utilizada para identificar e avaliar riscos associados em diferentes contextos como, por exemplo: a) esterilização de materiais hospitalares (NIEL-LAINÉ et al., 2011), manipulação de resíduos hospitalares (CARVALHO; SILVA, 2002 e SHINZATO et al., 2010) e riscos ambientais (DARBRA; DEMICHELA; MURÉ, 2008).

Os estudos mostram que esta ferramenta pode ser usada com sucesso em situações em que haja pouca informação disponível sobre o objeto de estudo. Um aspecto importante a ser destacado nestes estudos é que a identificação e análise dos riscos dependem muito da habilidade e experiência da equipe multidisciplinar

envolvida. Também é essencial que os critérios para a estimativa dos riscos sejam claramente especificados. Entre os trabalhos citados, pode-se verificar que os critérios de avaliação de riscos variam, mas em todos os casos foram considerados valores de severidade e probabilidade de ocorrência de eventos. Muitos destes estudos propuseram ações corretivas e preventivas para mitigar ou eliminar os principais riscos identificados para definir uma metodologia que permitia priorizar as ações que precisam ser tomadas.

Todo projeto novo ou em processo de atualização, incorpora algum elemento de mudança ou de inovação, mas na indústria química ou de processos biotecnológicos o grau de mudança de uma planta para outra é frequentemente considerável. Por exemplo, durante o deslocamento de uma unidade fabril ou durante a transferência de tecnologia entre centros de pesquisa e produção, haverá a constante necessidade de atualizar as técnicas e tecnologias que serão utilizados, e assim, facilitar a implementação dos processos. Entretanto, a quantidade de experiência previa expressa em procedimentos operacionais, guias de qualidade e regulamentos, pode ser pertinente apenas na implementação de novos processos, produtos, instalações e métodos de operação em um novo projeto.

A segurança no projeto de uma planta industrial para produção de biomassa recombinante depende fundamentalmente da aplicação dos vários quesitos de boas práticas de fabricação, do desenho da edificação (planta industrial) por meio das boas práticas de engenharia, e na extensa experiência e conhecimento prático de profissionais especializados que já estiveram envolvidos com atividades similares e que tiveram experiência direta na operação de plantas industriais (ANTUNES, 2004).

Tem-se tornado cada vez mais claro que embora os quesitos regulatórios e as normas sejam extremamente valiosos, é importante suplementá-los com uma antecipação imaginativa dos desvios, falhas ou perigos possíveis, principalmente quando estes novos projetos (processos, equipamentos, produtos) envolvem novas tecnologias ou mesmo do melhoramento das utilizadas atualmente.

As operações podem ser consideradas como elementos primordiais, nos quais se existir um desvio, o macro componente (equipamento, processo, etc.) pode apresentar ou responder como uma falha. O processo convencional de avaliação de risco em equipamentos e infraestrutura avalia apenas as falhas ou desvios destes macros elementos, entretanto, não é uma prática regular que a gestão de riscos avalie a origem detalhada desses desvios. Portanto, acredita-se que controlar desvios nas

operações unitárias é uma estratégia que permitirá ao responsável pela gestão de riscos evitar falhas na origem e não quando a falha se tornou realidade.

A necessidade de se verificar os projetos quanto a erros e omissões foi reconhecida há muito tempo (RODRIGUES-DA-SILVA, 2014), mas até alguns anos atrás, esta verificação era feita numa base individual. Os “especialistas” aplicavam suas habilidades ou experiência para discutir aspectos particulares de um determinado projeto, restringindo assim a aplicabilidade em sistemas similares ou dentro da mesma instituição para outros casos semelhantes. Este tipo de verificação individual, desde que executado antecipadamente e de forma consciente, obviamente melhora um projeto, mas claramente tem poucas chances de detectar perigos referentes à interação de um número de funções ou especialidades no entorno global. É provável que estes perigos resultem de uma interação inesperada de componentes ou métodos de operação aparentemente seguros em condições excepcionais.

Os estudos de análise de risco corroboram estas expectativas de forma harmoniosa e colocam a Figura dos diferentes “especialistas” em uma equipe multidisciplinar (DAS et al., 2014), onde todos podem emitir pareceres por intermédio de uma ferramenta estruturada, que propõe sinalizar, perigos/falhas e propor medidas de controle/mitigação de forma sistemática e abrangente.

2.4.1 Ferramentas de Análise de Risco

Os riscos concatenados aos perigos podem ser analisados por uma variedade de metodologias que aplicam ferramentas de análise de risco (RASPOTNIG; OPDAHL, 2013), estas podem seguir um procedimento estabelecido ou ser adaptadas segundo as necessidades do usuário, estas ferramentas podem ser classificadas em: qualitativas, quantitativas ou uma combinação de ambas (PAQUES; GAUTHIER, 2007 e MARHAVILAS; KOULOURIOTIS, 2011). Em uma estimativa qualitativa, o resultado da análise é uma expressão descritiva do nível de risco (por exemplo, baixo, médio ou alto) no entanto, a escolhade uma ferramenta ótima de análise de risco deve ser feita com objetividade e evitar procedimentos incipientes ou subjetividade.

Na análise quantitativa, dados quantitativos podem ser aplicados no parâmetro em estudo e é gerada uma pontuação numérica (PAQUES; GAUTHIER, 2007 e MARHAVILAS; KOULOURIOTIS, 2008). Nesta fase, esta ponderação numérica realiza-se entre a probabilidade de ocorrência e a severidade do dano (HAIMES,

2009). Dentre as ferramentas mais utilizadas dentro da indústria farmacêutica na avaliação de risco o guia ICH Q9 (2005) preconiza as ferramentas potenciais em que poderiam ser utilizadas.

1. Análise de Modos de Falhas e Efeitos (*Failure Mode Effects Analysis* – FMEA); esta ferramenta pode ser utilizada em instalações e equipamentos bem como operações de manufatura avaliando assim o efeito dos riscos em produtos e/ou processos, avalia a ordem de tratamento de desvios considerando a severidade, ocorrência e capacidade de detecção de falhas (LIPOL; HAQ, 2011).
2. Análise do Modo de falha, Efeitos e Criticidade (*Failure Mode, Effects and Criticality Analysis* – FMECA); é aplicada principalmente na avaliação de falhas e riscos associados aos processos de manufatura. Avalia a criticidade para cada falha potencial considerando três fatores: Modo Criticidade = Inacessibilidade do Item x Modo Razão de Não Confiabilidade x Probabilidade de Perda (LIPOL; HAQ, 2011).
3. Análise da Árvore de Falha (*Fault Tree Analysis* – FTA); a utilização desta ferramenta ajuda para analisar e estabelecer a origem e “rota” numa cadeia de eventos que resultaram numa falha ou evento crítico.
4. Análise de Risco de Pontos Críticos de Controle (*Hazard Analysis and Critical Control Points* – HACCP); pode ser utilizada para a identificação e gerenciamento de riscos associados com perigos químicos, biológicos e físicos. É fundamental para ajudar na identificação de pontos críticos de processo.
5. Estudo de Perigos e Operabilidade (*Hazard Operability Analysis* – HAZOP); utilizada nos processos de manufatura, fornecedores, infraestrutura e equipamentos para produção de insumos farmacêuticos.
6. Análise Preliminar de Perigos (*Preliminary Hazard Analysis* – PHA); esta ferramenta ajuda na análise de perigos onde as circunstancias do entorno dificulta a utilização de ferramentas extensivas.
7. Seleção e Classificação de Riscos (*Risk Ranking and Filtering*); ajuda a priorizar locais de manufatura que serão auditados pelos órgãos regulatórios.
8. Método de Monte Carlo é uma metodologia matemática computadorizada que possibilita avaliar o risco em análises quantitativas e tomadas de decisão.

9. Ferramentas estatísticas de apoio; estas ferramentas servem de apoio para as ferramentas principais e podem ser utilizadas em conjunto com elas (MILÁ et al., 2012). Entre elas destacam-se as cartas de controle, planejamento de experimentos (DOE), histogramas, diagrama de Pareto, análise de capacidade de processo e mais recentemente os processos estocásticos, tais como as cadeias de Markov.

Algumas ferramentas como o FMEA e FMECA consideram além da severidade e frequência a detectabilidade, ou seja, a capacidade de perceber-detectar o dano, como um dos parâmetros para estimar o risco (PETROVIC et al., 2014). Por tanto, independentemente da variedade de ferramentas de análise de risco disponíveis, na indústria biofarmacêutica são utilizadas metodologias estruturadas para atender principalmente os quesitos regulatórios.

Ainda que qualquer das metodologias de análise de risco citadas anteriormente possa ser utilizada para avaliação de riscos nas etapas da montante do processo produção de biomassa recombinante apresentado neste trabalho, as ferramentas de Análise de Modo de Falha e Efeito (FMEA) assim como o Estudo de Perigos e Operabilidade (HAZOP) apresentam características especificas para análise de risco neste tipo de sistemas. Esta seleção pode ser fundamentada em consideração às recomendações citadas no Anexo 1 do Guia ICH Q9 (2005). Dentro deste anexo é definido que ambas as ferramentas são as opções mais indicadas para serem aplicadas na análise de riscos dentro de processos de manufatura, equipamentos e infraestrutura.

A integração de estas ferramentas não é uma atividade inovadora dentro da indústria de processos. Por exemplo, Giardina e Morale (2015), realizaram a integração da técnica FMEA e FMECA com a técnica HAZOP para evitar omissões durante a identificação de falhas em uma planta de regasificação. Em outro estudo, Galluzzo, Bartolozzi e Puccia (2005), elaboraram um sistema “inteligente” para dar suporte à aplicação da metodologia integrada HAZOP e FMEA na identificação automática de desvios em plantas químicas. Ainda assim, não existe uma aplicação da metodologia integrada dentro da indústria farmacêutica ou biofarmacêutica. Adicionalmente, as atividades de uma planta de produção de biomassa recombinantes envolvem diferentes operações unitárias sujeitas à variabilidade de complexos equipamentos com níveis de automação diferenciados, os estudos pormenorizados

do impacto destas variáveis do processo produtivo podem influenciar a qualidade, eficácia e segurança dos produtos.

Desta forma, a Gestão de Risco para a Qualidade está presente nesta proposta a partir do viés das ferramentas de análise de risco de forma a propor a qualificação dos principais equipamentos que envolvem as operações unitárias de uma planta de produção de biomassa recombinante, além de analisar mais detalhadamente a integração das ferramentas FMEA e HAZOP para este propósito.

2.4.1.1 Análise de Modo de Falha e Efeitos – FMEA

Segundo Stamatis (2003), a metodologia utilizada pelo FMEA, busca, além de identificar falhas potenciais de forma sistemática, identificar seus efeitos e definir ações que visem reduzir ou eliminar o risco associado a estas falhas, reduzindo assim o risco do produto ou processo. O FMEA deve ser aplicado nos estágios iniciais em projetos de sistemas, produtos, componentes, serviços ou processos, e deve ser continuamente reavaliado durante o ciclo de vida do sistema, produto, componente, serviço ou processo (BAHRAMI; BAZZAZ; SAJJADI, 2012).

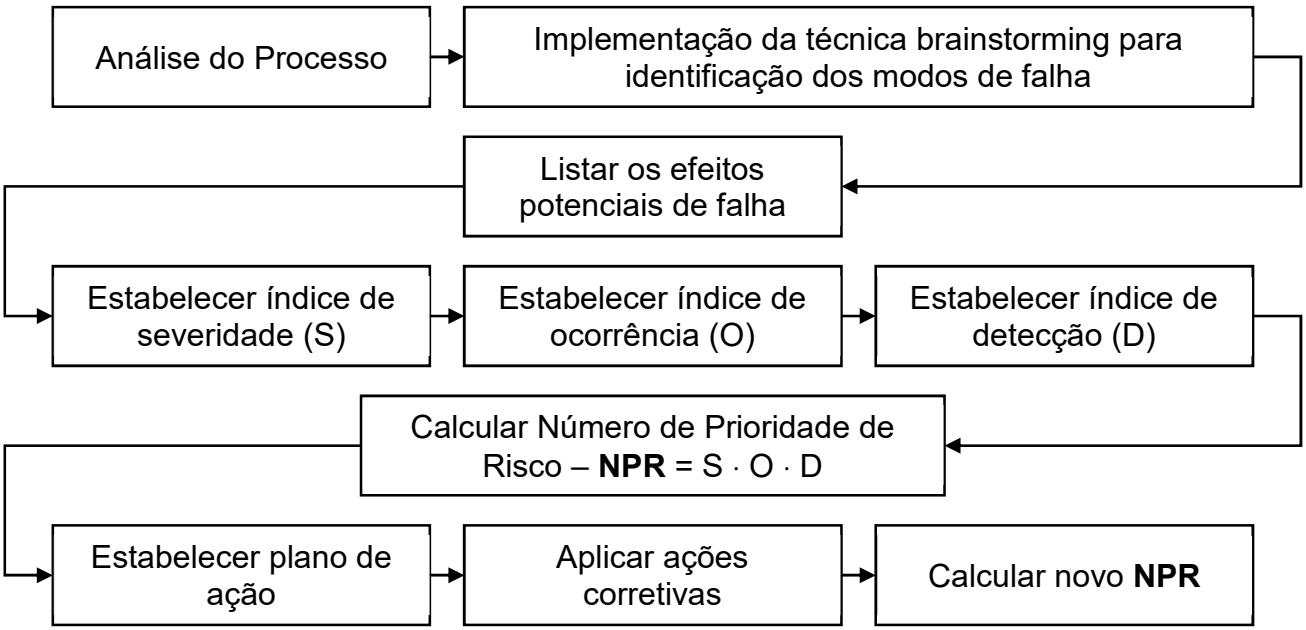
O método FMEA traz uma sequência lógica e sistemática de avaliar as formas possíveis pelas quais um sistema ou processo está mais sujeito a falhas (Van LEEUWEN et al., 2009). O FMEA avalia a severidade das falhas, a forma como as mesmas podem ocorrer e, caso ocorram, como eventualmente poderiam ser detectadas antes de gerar impactos negativos ou levarem a reclamações no cliente (LIPOL; HAQ, 2011). Assim, com base nestes três quesitos: severidade, ocorrência e detecção (XIAO et al., 2011), o método FMEA leva a uma priorização de quais os modos de falha levam a um maior risco ao produto.

Comumente, a metodologia FMEA é confundida com a Análise de Criticidade, de Modo e Efeito de Falhas ou FMECA. Diante disso, Fragassa e Ippoliti (2016) sinalizaram que a diferencia entre ambas as metodologias é que no FMEA o risco é calculado utilizando o Número de Priorização de Riscos (NPR), este número é obtido com a multiplicação da Severidade (S), Ocorrência (O) e a Detectabilidade (D) em escala de 1 até 10 (LIPOL; HAQ, 2011). Em contraste no FMECA, a análise de criticidade (CA) relaciona taxa de falha e severidade do efeito de falha e a criticidade de um modo de falha é calculada com a multiplicação do número de elementos em risco, a severidade e ocorrência. A criticidade de um elemento é igual à soma da criticidade da falha do elemento. Isto posto, a metodologia FMEA atende a análise de

riscos necessária para projetos, sem ser necessária a avaliação da criticidade das falhas no processo.

Para um correto planejamento e implantação da ferramenta FMEA é necessário se obter um conhecimento minucioso do sistema. Antes de relatar o resultado da aplicação prática do FMEA, é importante ressaltar que a primeira fase do trabalho consiste na coleta exaustiva de dados e informações sobre os produtos, linhas de produção e máquinas através de visitas às unidades de produção e sendo possível realizar entrevistas pessoais com o pessoal envolvido nas áreas. Na Figura 17 é apresentada a metodologia da ferramenta FMEA para identificação de riscos em processos (MAITI, 2014).

Figura 17 - Metodologia da ferramenta FMEA para identificação de riscos.



Fonte: Adaptado de MAITI, 2014.

2.4.1.2 Estudo de Perigos e Operabilidade – HAZOP

A metodologia HAZOP é indicada durante a análise de riscos na implementação de novos processos/sistemas/equipamentos e/ou infraestrutura durante a fase de projeto ou na modificação ou atualização dos já existentes em operação ao longo do tempo de vida do projeto (ROSSING et al., 2011). O ideal na realização do HAZOP é que o estudo seja desenvolvido antes mesmo da fase de detalhamento e construção do projeto, evitando com isso que modificações tenham que ser feitas, quer no detalhamento ou ainda nas instalações, quando o resultado do HAZOP for conhecido. Esta metodologia é baseada em um procedimento que gera

perguntas de maneira estruturada e sistemática através do uso apropriado de um conjunto de palavras guias aplicado a pontos críticos do sistema em estudo (PÉREZ-MARÍN; RODRÍGUEZ-TORAL, 2013).

A metodologia HAZOP utiliza a técnica *brainstorming* para facilitar o procedimento de identificação de desvios, pensando em todos os modos pelos quais um evento indesejado ou problema operacional possa ocorrer (DUNJÓ et al., 2011). Para evitar que algum detalhe seja omitido, a reflexão deve ser executada de maneira sistemática, analisando cada circuito, linha por linha, para cada tipo de desvio passível de ocorrer nos parâmetros de funcionamento. Para cada linha analisada é aplicada a série de palavras guias, identificando os desvios que podem ocorrer caso à condição proposta pela palavra-guia ocorra (DUNJO, 2010).

O principal objetivo do HAZOP é investigar de forma minuciosa e metódica cada segmento de um processo, focalizando os pontos específicos do projeto chamados “nós” (um de cada vez), visando descobrir todos os possíveis desvios das condições normais de operação, utilizando palavras guia (parâmetros) e os possíveis desvios que possa afetá-los (DE LA O et al., 2015), identificando as causas responsáveis por tais desvios e as respectivas consequências (MOHAMMADFAM et al., 2012). Uma vez verificadas as causas e as consequências de cada tipo de desvio, esta metodologia permite propor e estabelecer medidas para eliminar ou controlar o perigo ou para sanar o problema de operabilidade da instalação (BS IEC, 2001).

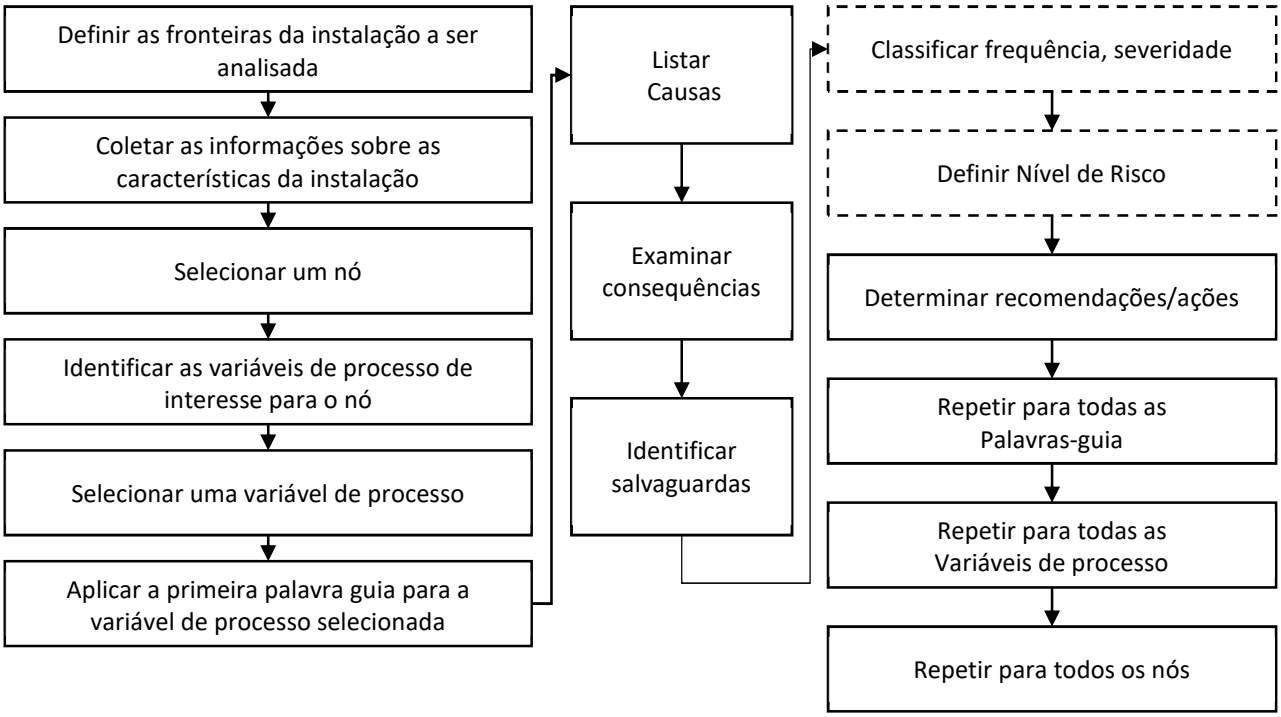
Para avaliar riscos nos processos e equipamentos da etapa a montante do processo de produção de biomassa recombinante segue o procedimento estabelecido pela técnica de estudo de caso. Desta forma, foram estruturadas questões para dar suporte na avaliação de riscos e identificar a forma em que poderiam ser gerados.

Tais questões foram utilizadas para obtenção das informações e geração de dados que serviram como base na aplicação das ferramentas. Uma vez estabelecidas as estratégias de estudo de caso, as análises dos sistemas atualmente em andamento foram focalizadas nas operações unitárias envolvidas nas etapas de propagação celular, biorreação e centrifugação celular, ruptura e lavagem dos corpos celular. A caracterização dos fenômenos existentes em cada um dos equipamentos utilizados nas etapas produtivas permitiu a identificação das operações unitárias de maior impacto nos processos.

Na Figura 18 é apresentada a metodologia da ferramenta HAZOP para identificação de riscos em processos (POULOSE, 2012), onde o cálculo do nível de

risco, é realizado com o suporte da matriz de risco e não faz parte da metodologia tradicional.

Figura 18 - Etapas de um Plano de Gerenciamento da ferramenta HAZOP para identificação de riscos.



Fonte:POULOSE, 2012.

A aplicação da metodologia integrada de análise de risco nas operações unitariasé efetuada sob a responsabilidade de um grupo multidisciplinar de especialistas com experiência nas metodologias de análise de risco. O grupo é responsável pela identificação e definição da causa e consequências dos riscos utilizando a técnica de *brainstorming* (KHAN, 1998), onde uma serie de ideias e conceitos criativos tornam-se critérios para dar resposta ás hipóteses propostas.

2.4.2 Determinação da probabilidade eventos não desejados

Habitualmente, o processo de determinação da probabilidade de eventos em análise de riscos, tem como propósito mensurar como um evento pode acontecer. Esta atividade é realizada por uma equipe multidisciplinar, onde o grupo de especialistas, analisa informações, dados e registros de eventos anteriores do próprio

sistema ou em processos similares (NEDELJAKOVÁ, 2007), utilizando com base a experiência profissional e critérios subjetivos.

Ainda que para as metodologias de análise de risco a probabilidade proposta pela equipe multidisciplinar tem oferecido o suporte necessário para estimar o Nível de Risco que é resultado do múltiplo da severidade pela probabilidade (VLĂDUȚ-SEVERIAN, 2014), é necessário contar com ferramentas que permitam validar esse valor da probabilidade dos eventos não desejados.

O processo avaliado neste trabalho, é um processo novo que consta de operações que não foram utilizadas ainda na empresa e equipamentos desenhados especificamente para atender uma demanda particular. Desta forma é necessário contar com uma ferramenta que permita projetar a evolução de um sistema de valores no futuro sem levar a consideração eventos passados. Esta necessidade torna-se de maior importância quando o sistema sob estudo é novo ou quando considera elementos inovadores, nos quais não existem registros históricos de desvios.

2.4.2.1 Processos Estocásticos

Para atender esta necessidade, os processos estocásticos permitem definir o valor da probabilidade de eventos em cada estágio. Um Processo Estocástico é definido como uma coleção de variáveis randômicas $X_{(t)}$ indexadas por um parâmetro t pertencente a um conjunto T. Frequentemente T é tomado para ser o conjunto dos inteiros não-negativos (porém, outros conjuntos são perfeitamente possíveis) e $X(t)$ representa uma característica mensurável de interesse no tempo t.

Os Processos Estocásticos são de interesse para descrever o procedimento de um sistema operando sobre algum período de tempo, com isso, em termos formais, a variável randômica $X(t)$ representa o estado do sistema no parâmetro (geralmente tempo) t. Portanto, pode-se afirmar que X(t) é definido em um espaço denominado Espaço de Estados.

Os Processos Estocásticos podem ser classificados como:

a) Em relação ao Estado
    a. Estado Discreto (cadeia): $X_{(t)}$ é definido sobre um conjunto enumerável ou finito.
    b. Estado Contínuo (sequência): $X_{(t)}$ caso contrário.
b) Em relação ao Tempo (Parâmetro)
    a. Tempo Discreto: t é finito ou enumerável.

b. Tempo Contínuo: *t* caso contrário.

Existem vários tipos de Processos Estocásticos, no entanto, as Cadeias de Markov tornam-se uma opção viável para estimar a probabilidade de desvios nos sistemas uma vez que são definidas como um processo estocástico caracterizado por seu estado futuro depender apenas do seu estado atual, sendo que os estados passados não influenciam no estado futuro (TOLVER, 2016).

2.4.2.2 Cadeias de Markov

A perda de memória é a base da caracterização das cadeias de Markov e ela estabelece que em um conjunto de estados discretos o futuro só depende do estado presente, ou seja, os estados anteriores são irrelevantes para a predição dos estados seguintes, desde que o estado atual seja conhecido. Em termos de probabilidades, uma cadeia de Markov a tempo discreto com espaço de estados ***S*** é um processo estocástico $\{Xn\}_{n \in T}$, onde ***T*** = {0, 1, 2, ...}, tal que se verificam as seguintes propriedades:

- Para qualquer $i \in S$ tem-se:
  $P(X_0 = i) = P_i$
- Para quaisquer $i, j \in S$, e $n \in T$:
  $P(X_{n+1} = j | X_n = i) = P_{ij}$.
- Para quaisquer $n \in T$ e $i_0, i_1, ..., i_{n-1}, i, j \in S$, vale a condição:
  $P(X_{n+1} = j | X_n = i, X_{n-1} = i_{n-1} . . . , X_0 = i_0) = P(X_{n+1} = j | X_n = i)$.

No caso $X_n = i$ diz-se que o processo no instante *n* está no estado *i*. Em especial, a terceira propriedade estabelece que dado o presente (X_n), o futuro (X_{n+1}) e o passado ($X_0, X_1, ..., X_{n-1}$) são independentes.

3.4.2.3 Matriz de Transição

A matriz de transição *T* é a representação matricial das probabilidades de transição p_{ij}, sendo a matriz que condiciona as mudanças de estado (Figura 19). É uma matriz quadrada k*k, sendo k o número de estados envolvidos no sistema.

Figura 19 - Matriz de Transição para cálculo da probabilidade em *n* períodos.

$$T = \begin{bmatrix} p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1k} \\ p_{21} & p_{22} & \cdots & p_{2k} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ p_{k1} & p_{k2} & \cdots & p_{kk} \end{bmatrix},$$

Fonte: NORRIS, 1997.

Cada elemento p_{ij} é um número real que significa a probabilidade de um sistema evoluir de um *j*-ésimo estado para um *i*-ésimo estado. A soma de todas as probabilidades de uma coluna terá que ser igual a 1: $p_{1j} + p_{2j} + ... + p_{kj} = 1$, $j = 1, 2, 3, .., k$ (STROOCK, 2005). Desta forma, é possível estimar a probabilidade de um evento em um período determinado utilizando um modelo probabilístico. Sendo assim, a matriz de transição pode ser considerada uma ferramenta com a capacidade de dar suporte dentro da indústria de processos para estimar a probabilidade de um evento quando a carência de dados ou registros não estão disponíveis (SHÜLLER *et al*, 1997).

2.5 Estudo de Caso

Para a execução deste trabalho foi necessário utilizar uma metodologia de investigação que permitisse direcionar a pesquisa que foi desenvolvida e aplicada, para atender esta necessidade, a técnica de estudo de caso foi selecionada para direcionar o entendimento do fenômeno e desenvolver possíveis soluções diante um problema.

O estudo de caso pode ser considerado como uma ferramenta de pesquisa característica da área técnico-cientifica. No entanto, devido a sua utilidade, tem se expandido amplamente para outras áreas de conhecimento como áreas sociais, administrativas, médicas, dentre outras. O estudo de caso analisa temas inovadores, fenômenos contemporâneos que representam situações problemáticas reais, das quais o pesquisador não tem controle, mas procura o entendimento de tal fenômeno ou situação (FLYVBJERG, 2006). Portanto, com a utilização deste método o pesquisador tenta responder o como e o porquê do evento utilizando diversas fontes de informação e banco de dados como base da pesquisa.

Para autores como Kinzel (2015) e Wallach et al. (2014) o estudo de caso pode ser interpretado como uma estratégia de pesquisa encaminhada para compreensão das dinâmicas presentes em contextos singulares, que poderia ser para o estudo de um único caso ou um grupo deles, utilizando diversos métodos para colheita de evidencia tanto qualitativa como quantitativa, com o único intuito de gerar, descrever, verificar e validar a teoria. Desta forma é possível concluir que o estudo de caso cumpre com um papel muito importante na área da pesquisa, isto é, porque oferece ajuda na obtenção do conhecimento dos fenômenos atuais e ajuda na geração de novas teorias, bem como para rejeitar as teorias inadequadas.

Por tanto, esta ferramenta é de grande utilidade para acrescentar o conhecimento num âmbito real em base a diversas possibilidades, variáveis e fontes, porque com o método de estudo de caso é possível determinar o método de análise bem como as diferentes alternativas e estratégias de ação para resolver o problema em base de critérios objetivos e bem fundamentados. Mesmo que não exista uma determinada estrutura para elaborar um estudo de caso, existem cinco elementos principais que devem ser considerados para estabelecer um estudo de caso: elaboração de questões de pesquisa, propostas teóricas, unidades de análise, vinculação lógica de dados com questões elaboradas e finalmente interpretação de resultados obtidos (ROWLEY, 2002). Desta forma, em base aos componentes propostos foi possível montar a estrutura de uma guia para elaboração do estudo de caso:

a) Transcrição do caso que se procura investigar: nesta etapa o sistema sob investigação foi relatado de forma detalhada. Mantendo em todo caso uma visão objetiva e sem alterações.
b) Antecedentes do caso; foi apresentada toda a informação previa e relevante em quanto ao caso e o fenômeno. A função principal destas informações foi ajudar na investigação e análise dos dados obtidos.
c) Questões de pesquisa: são as perguntas que guiaram o objetivo da pesquisa: como, quando, por quê, dentre outras.
d) Conceitos e teorias: aqui os conceitos e teorias expostos foram utilizados nos processos de análise dos dados obtidos e na sua interpretação.
e) Tópicos principais da pesquisa: foram enumerados os tópicos fundamentais para o estudo de caso.

f) Análise e interpretação dos dados: por meio de diferentes técnicas foram aplicados parâmetros para a análise e interpretação dos dados.
g) Elaboração de conclusões.

Assim sendo, é possível estabelecer o procedimento para elaboração do estudo de caso:

1. Identificar um fenômeno de estudo e caracterizá-lo completamente.
2. Colheita de informações e dados referentes ao fenômeno em estudo.
3. Estruturação e organização das informações.
4. Definição e desenvolvimento do marco teórico.
5. Cotejo de dados e informações com o marco teórico.
6. Seleção da informação útil do marco teórico e dados.
7. Elaboração da lista de questões que servirão como base para o estudo de caso.
8. Definição dos principais aspectos e temas da pesquisa.
9. Análise da informação selecionada em base as questões formuladas e em aspectos relevantes a serem investigados.
10. Elaboração das conclusões.

A essência do estudo de caso é a combinação de diferentes níveis de técnicas, metodologias, estratégias e teorias. Portanto, o estudo de caso é desenvolvido através do domínio da combinação destes elementos (SEAWRIGHT; GERRING, 2008). A combinação do enfoque qualitativo e quantitativo é estabelecida nos estudos de caso, no entanto, os padrões de qualidade diferentes sobre a verdade, a aplicabilidade, consistência e neutralidade em pesquisas qualitativas e quantitativas são difíceis de codificar. Como estudo de caso, neste trabalho foi analisado um sistema instalado em Bio-Manguinhos Fiocruz, no qual foi possível identificar o cumprimento dos princípios estabelecidos pela metodologia mencionados anteriormente. É desta forma que é primordial estabelecer o contexto e perfil da empresa para entender a abrangência e significância deste trabalho.

2.5.1 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BIO-MANGUINHOS

Há 41 anos, o Instituto Bio-Manguinhos vem ampliando o acesso à saúde da população brasileira por meio da pesquisa, desenvolvimento e oferta de novos produtos que previnem, diagnosticam e tratam doenças.

Para se firmar como o maior laboratório público da América Latina, Bio-Manguinhos escreveu parte da história da saúde pública do Brasil. Teve atuação decisiva na erradicação da poliomielite no país e nas Américas, ao firmar parceria com instituições japonesas com o intuito de produzir a vacina contra a doença; foi fundamental no controle do sarampo e da febre amarela, tornando-se um dos principais produtores da vacina no mundo, já tendo exportado para mais de 70 países. Para manter seu protagonismo, o Instituto busca a renovação e a inovação por meio de acordos de transferência de tecnologia, e projetos de desenvolvimento autóctone contribuem para a ampliação do portfólio e absorção de novos conhecimentos de forma mais rápida.

O cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) assim como a certificação de qualidade de seus laboratórios fazem do Instituto um agente estratégico no âmbito do Complexo Econômico Industrial da Saúde (CEIS). Atualmente, há 11 Parcerias para Desenvolvimento Produtivo (PDPs) em andamento na unidade. Através de PDPs o governo federal oferta uma gama maior de produtos por meio do Sistema Único de Saúde. O portfólio do Instituto tem 30 produtos: 10 vacinas, 15 reativos para diagnóstico e 5 biofármacos. Por ano, são milhões de unidades fornecidas aos programas do Ministério da Saúde.

Com a crescente modernização de seu parque industrial, o número de vacinas entregue para o Programa Nacional de Imunizações (PNI) do MS aumenta anualmente. Em 2017, Bio-Manguinhos atendeu à 32,9% do mercado público nacional de vacinas, incluindo fornecedores internacionais, e 39,27% considerando apenas os produtores nacionais. O Instituto entregou mais de 132 milhões de doses de vacinas. Foram entregues quase 10 milhões de frascos de biofármacos e 7,5 milhões de kits para diagnóstico. Os produtos de Bio-Manguinhos garantem à população brasileira acesso gratuito a Imunobiológicos de alta tecnologia e permitem a redução dos gastos do Ministério da Saúde.

Atualmente, Bio-Manguinhos dispõe de uma infraestrutura que totaliza 57,8 mil m² de área construída, no campus sede da Fiocruz, em Manguinhos, Rio de Janeiro. A unidade ocupa áreas nos pavilhões Rocha Lima, Rockefeller, Henrique Aragão e no Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV), onde está concentrada a maior parte da sua atividade industrial. O Centro Henrique Penna (CHP) para Protótipos, Biofármacos e Reativos para Diagnóstico, abriga a maior planta de protótipos da América Latina, preenchendo uma lacuna na cadeia de inovação do país.

O prédio principal, é composto de 6 andares, sendo que 2 destinados a área de produção (Reativos para diagnóstico e biofármacos), 1 destinado a Planta de Protótipos e 3 pavimentos destinados a instalações de Utilidades. A área de produção de Ingrediente Farmacêutico Ativo de Biofármacos (IFA) tem capacidade instalada para produzir em torno de 17,5 milhões de frascos na apresentação de 2000UI de alfaepoetina, e cerca de 6 milhões de frascos na apresentação de 3MUI de alfainterferona 2b. Esta Planta permitirá a nacionalização desses dois produtos que já são fornecidos atualmente para o Ministério da Saúde por Bio-Manguinhos assim como viabilizará a produção de outros como a Filgrastima, a Betainterferona e a Somatropina que são frutos de Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo.

Para manter o nível de excelência, o investimento na ampliação e modernização da infraestrutura é constante. É por esse motivo que a análise de risco dos sistemas instalados na etapa de produção de biomassa recombinante dentro da área para produção da alfainterferona no Centro Henrique Pena (CHP) foi realizada previamente ao início das atividades (*startup*). Consequentemente, será possível agir para tomar ações preventivas que permitam a correta operação dos processos cumprindo as premissas de qualidade e segurança que são quesitos primordiais para a instituição.

A readequação e expansão das áreas físicas é parte do processo de inovação que se implementa em Bio-Manguinhos, assim como a aquisição de novos equipamentos. Portanto, em 2018 espera-se que ambas as áreas de produção de biofármacos comecem com a qualificação dos processos, e da infraestrutura, e posteriormente lotes de engenharia e simulação asséptica, para finalizar com os lotes de consistência dos produtos, que darão início a operação de rotina.

A planta de protótipos destina-se ao aumento de escala de produtos desenvolvidos em bancada e à fabricação de lotes para estudos clínicos. O empreendimento permite incorporar tecnologias inéditas, ampliando a capacitação tecnológica e a produção de insumos estratégicos no Brasil.

A área de Produção de Reativos para Diagnóstico permitirá ampliar a oferta destes produtos fornecidos aos programas do MS. A capacidade instalada para produção será de 20 milhões de reações por ano. Atualmente, essa capacidade é de 8 milhões. A operação da planta de reativos, a primeira a ser validada, teve início no primeiro semestre de 2017.

3. METODOLOGIA

Neste capítulo, é descrita toda a explicitação e fundamentação no que diz respeito às opções metodológicas e ao processo seguido neste trabalho, e está subdivido em duas secções. Na primeira, são apresentados os critérios seguidos para estruturar a metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA de modo a fundamentar a estratégia de investigação escolhida. Na segunda secção, é apresentado o procedimento seguido para aplicar a metodologia integrada e elaboração do relatório de avaliação de riscos.

3.1 Integração das ferramentas de Análise de Perigos e Operabilidade (HAZOP) e Análise de Modo de Efeito de Falha (FMEA) para avaliação de riscos

A Integração das ferramentas de análise de risco nas operações unitárias que compõem o sistema de produção de biomassa recombinante, foi baseada no procedimento sistemático descrito anteriormente.

Como já mencionado, as duas ferramentas de análise de risco estão constituídas por procedimentos semelhantes, no entanto, a principal diferença que existe entre as metodologias é o tratamento dos dados, o enfoque da análise das informações, e a análise dos dados disponíveis, isto pode ser percebido uma vez que o FMEA realiza a análise de riscos em base a registros e dados históricos, e em contrapartida, o HAZOP precisa do uso de técnicas auxiliares que permitam estimar a probabilidade de eventos futuros.

É desta forma que, para a consolidação da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA, foram avaliados cada um dos elementos que as compõem, onde, segundo o critério próprio do grupo de especialistas, a seleção do componente das etapas da metodologia integrada a ser utilizado, foi justificada segundo a sua capacidade de satisfazer as necessidades próprias do projeto. A seguir são apresentadas as considerações utilizadas para a seleção dos elementos da metodologia integrada.

3.1.1 Avaliação dos componentes das ferramentas HAZOP e FMEA para definição da metodologia integrada de análise de risco.

Os critérios utilizados para definição da metodologia de integração das ferramentas de análise de risco FMEA e HAZOP foram definidos considerando os seguintes conceitos:

1. Definição do sistema: para ambas metodologias FMEA e HAZOP a etapa inicial de aplicação consistiu na definição do "*o quê*" vai ser analisado e a abrangência do estudo, portanto esta etapa foi considerada a mesma para a metodologia integrada.
2. Coleta de informações e dados: foi considerada como a compilação de referências especificas do sistema em análise. Trata-se de conjunto de informações e dados técnicos que descrevem as características, componentes, funções, e procedimentos que atuam no limite estabelecido do sistema sob estudo. Desta forma, independentemente da metodologia, seguir este procedimento foi necessário para a execução do trabalho.
3. Elemento de estudo: pode ser considerado como uma característica especifica que compõe o sistema. A seleção de um elemento específico ajudou na rápida aplicação da metodologia e permitiu avaliar o impacto que esse item desempenha no sistema. Para o HAZOP esse elemento é definido como ***Nó*** e no FMEA é conhecido como ***Componente*** de estudo. É importante destacar que no caso do HAZOP, um nó é restringe a investigação para uma região ou componente único, permitindo assim especificar as variáveis de processo (parâmetros), e os desvios que o compõem, atingindo desta forma a profundeza necessária para a análise dos riscos. Assim sendo, para este trabalho as operações unitárias que desempenham uma função específica em cada equipamento foram definidas como os Nós de estudo.
4. Identificação de falhas: a seguinte etapa consistiu em listar as falhas no componente ou nó, utilizando como base a análise dos parâmetros e os potenciais desvios, utilizando como referência as palavras guia da ferramenta HAZOP.
5. Determinação de causas e consequências (efeitos): a equipe multidisciplinar propôs as circunstâncias que poderiam dar origem a uma falha ou desvio, bem como o efeito resultante caso esse fenômeno ocorra. Em ambas as

metodologias, são identificadas as causas e definidas as consequências, sendo assim elementos comuns entre as metodologias.

6. Controles (salvaguardas): a identificação destes elementos instalados no sistema serve de apoio ao grupo multidisciplinar para determinar o grau de detecção, e definir os índices de severidade e frequência de desvios no sistema. Concluindo assim que quantificando mais e melhores salvaguardas o nível de severidade e frequência pode ser inferior comparado com um sistema sem a presença destes elementos. Ainda que os controles são considerados na ferramenta HAZOP, é no procedimento do FMEA que estas medidas podem ser quantificadas para definir a priorização de ações que devem de ser tomadas para mitigar ou eliminar os riscos.
7. Frequência ou probabilidade: são os elementos que fundamentam o cálculo do nível de risco. Por conseguinte, níveis elevados de risco são o resultado de graus elevados de frequência de eventos.

   No caso do HAZOP, Gilardi e Gotti (2013) estabelecem que a frequência é uma característica não particular do desta metodologia, posto que, frequentemente o HAZOP precisa de suporte de matrizes de risco, que avaliam tanto a frequência, como a severidade para definir o nível de risco, os critérios estabelecidos pelos autores estão relatados no Anexo III e não foram utilizados como critérios de frequência ou probabilidade para este trabalho. Ainda assim, os autores estabeleceram os índices de frequência segundo a característica do evento, tais como;

   a. Frequência por lotes com desvios;
   b. Frequência por tempo estimado;
   c. Probabilidade do evento a ocorrer;

No entanto, a frequência ou probabilidade de eventos segundo o procedimento da ferramenta FMEA sinalizado por Gupta, Shende e Shaikh (2013), segue a ponderação ilustrada na Tabela 2 que permite avaliar valores tanto qualitativos como quantitativos em uma maior escala, reduzindo desta forma, a interpretação errada de eventos e dando margem a uma maior abrangência de intervalos de tempo ou número de falhas. Desta forma, para este trabalho somente foi considerada esta avaliação da frequência no escopo do FMEA, porque permite uma melhor definição de períodos ou

números de eventos, permitindo assim definições mais objetivas na integração das ferramentas.

Tabela 2 – Índices de probabilidade e frequência que representam a ocorrência de eventos durante a avaliação do nível de risco.

Índice	Probabilidade	Frequência	
1	Improvável	<1 em 1.500.000	
2	Não provável, remoto	1 em 150.000	
3	Incomum mas pode acontecer	1 em 15.000	
4	< 1 vez em 10 processos	1 em 2.000	
5	< 1 vez a cada 4 processos	1 em 400	
6	< 1 vez a cada 2 processos	1 em 80	
7	> 1 vez a cada 2 processos	1 em 20	
8	A maioria do tempo	1 em 80	
9	Quase continuo	1 em 3	
10	Constante; contínuo	>1 em 2	

Fonte: GUPTA; SHENDE e SHAIKH, 2013.

Cálculo da probabilidade

Para determinação da probabilidade de eventos em este estudo, o grupo multidisciplinar propus o valor das probabilidades no estado imediato e no lote (período" seguinte. Sendo a probabilidade inicial p_{11} do evento representada pela probabilidade da falha no primeiro estágio (lote atual) e a probabilidade p_{21} a probabilidade de um evento não desejado acontecer após o segundo estágio (segundo lote):

$$Estagio \quad \begin{array}{c} \\ Lote\ 1 \\ Lote\ 2 \end{array} \begin{array}{c} \begin{array}{cc} Sim & Não \end{array} \\ \begin{bmatrix} P_{11} & P_{12} \\ P_{21} & P_{22} \end{bmatrix} \end{array} Probabilidade$$

Para cada um dos estágios do lote inicial (P_{11}) foi considerado o valor da probabilidade proposto pelo grupo de especialistas. Da mesma forma, o valor (P_{21}) representa a probabilidade em que um evento negativo possa acontecer na produção de um segundo lote (corrida do sistema). Este valor foi estimado de igual forma pelo grupo de especialistas e normalmente pode ser considerado como levemente superior que a probabilidade inicial.

Considerando que para a avaliação de riscos se faz necessário considerar somente a probabilidade em que os desvios se tornam realidade, apenas serão consideradas as probabilidades da coluna identificada como SIM. Assim, uma vez que a probabilidade inicial dos eventos foi definida, foram calculadas as probabilidades em cada estágio (lotes) da campanha do produto (capacidade da planta = 52 lotes/ano) da seguinte forma:

Para o segundo estágio: $P^2 = P^1 P^1 = PP$

Para o terceiro estágio: $P^3 = P^2 P^1 = P^1 P^2 = P^2 P$

Para o estágio *n*: $P^n = P^{(n-k)} P^{(k)} = P^{52}$

O valor da probabilidade que foi considerado para o cálculo do nível de risco, levou em consideração os valores da coluna *SIM* (P_{11} *e* P_{21}) que após o cálculo da probabilidade no estágio ***n,*** permaneceu estável (sem variabilidade significativa). Após calcular a probabilidade, foi utilizada a Tabela anterior para definir o nível de probabilidade-frequência.

8. Determinação da Severidade: no HAZOP, é possível estabelecer valores de severidade considerando a característica dos eventos, na Tabela 13 são apresentados os diferentes níveis de severidade para cada categoria de impacto na indústria biofarmacêutica propostos pelo grupo multidisciplinar. No Anexo III estão relatados os critérios de identificação do impacto da severidade dos desvios utilizados na metodologia HAZOP.

Para o FMEA a severidade pode ser mensurada tendo em mente as diferentes características que podem caracterizar um nível de severidade, tais como o tempo de parada de processo, dano à infraestrutura, quesitos regulatórios, dentre outros. Esta estrutura ajudou na rápida definição do grau de severidade, evitando desta forma a necessidade de tomar uma decisão dentre os diferentes tipos de efeitos para priorizar a severidade como acontece no HAZOP.

Desta forma na Tabela 3 é apresentado o ranking de nível de severidade adaptado para o caso da indústria biofarmacêutica (GUPTA; SHENDE; SHAIKH, 2013).

Tabela 3 - Critérios para identificação do nível de severidade para a ferramenta FMEA dentro da indústria biofarmacêutica.

Índice		Nível	Critério da Severidade
	1	Nenhum	A falha na operação unitária não afeta a performance do processo e não prejudica o produto
	2	Muito Menor	Corta interrupção da produção. Uma pequena parte dos insumos ou produtos deve ser retrabalhada (quando possível), dentro da área do processo. A falha na operação é identificada por controles em processo
	3	Menor	Pequena interrupção do processo, uma parte dos produtos pode ser reprocessada ou descartada. A falha é detectada facilmente pelos controles
	4	Muito Baixo	Pequena interrupção do processo, uma parte dos produtos pode ser descartada. A falha pode ser detectada pelos controles
	5	Baixo	Pequena interrupção do processo, existe a possibilidade de descartar o produto. Os insumos não podem ser retrabalhados
	6	Moderado	Interrupção do processo. Danos moderados nos processos e equipamento. Existem perdas moderadas do produto
	7	Alto	Possível interrupção prolongada do processo. Os danos podem afetar os processos e equipamento. Existem grandes perdas do produto
	8	Muito Alto	Interrupção prolongada do processo. Grande possibilidade de afetar infraestrutura, equipamentos, processos e pessoal. Podem existir não-conformidades regulatórias
	9	Crítico	Danos na infraestrutura, equipamentos, processos e pessoal. O modo de falha potencial afeta a segurança da operação e/ou gera não-conformidades regulatórias. É necessário parar a operação até que os desvios sejam reduzidos
	10	Catastrófico	Danos elevados na infraestrutura, equipamentos, processos e pessoal. O modo de falha potencial afeta a segurança da operação e/ou gera não-conformidades regulatórias. O processo deve ser interrompido até tomar ações para eliminar os perigos. Perda total do produto

Fonte: GUPTA; SHENDE e SHAIKH 2013.

1. Cálculo do nível de risco: Para estabelecer parâmetros de comparação entre o nível de risco e a forma em que os sistemas de detecção permitem priorizar o tratamento de desvios, foi necessário primeiramente caracterizar o nível de risco do sistema. Desta forma, para riscos aceitáveis, ações podem ser consideradas após uma avaliação de custo benefício. No caso dos riscos não desejáveis, é recomendável aplicar medidas que permitam reduzir o nível de risco até o nível aceitável. Finalmente, para os riscos inaceitáveis, medidas tem que ser tomadas imediatamente e a operação tem que ser interrompida até o tratamento das falhas. Na Figura 20 (FITCH, 2013) é apresentada a matriz para determinação do nível de risco considerando o produto da severidade e a frequência ou probabilidade (S x F).

Figura 20 - Matriz de cálculo do nível de risco resultante do produto da severidade e a frequência (ou probabilidade).

NR	SEVERIDADE									
FREQUÊNCIA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

	Risco Aceitável
	Risco Não Desejável
	Risco Inaceitável

Fonte: FITCH, 2013.

2. Detectabilidade: esta é uma característica única da ferramenta FMEA (BAHRAMI; BAZZAZ; SAJJADI, 2012). A detectabilidade é a capacidade do sistema para a identificação ou controle da falha. Ainda que a metodologia HAZOP considera salvaguardas ou fatores relevantes para avaliação da severidade e frequência de eventos, é uma qualidade da metodologia FMEA a utilização da capacidade de detecção de falhas desses dispositivos, permitindo assim uma melhor definição do nível de risco. Na Tabela 4, são apresentados os critérios de detectabilidade e os índices para cada modo de falha de acordo com os 10 níveis de frequência e severidade considerados neste trabalho.

Tabela 4 - Critérios para identificação do nível de detectabilidade para a ferramenta FMEA dentro da indústria biofarmacêutica.

Índice		Descrição	Definição
	10	Não é possível detectar	Não existe procedimento ou dispositivo para detecção da falha
	9	Detecção muito remota	O produto é aceito baseado no número de amostras dentro da faixa de aceite
	8	Remota	O produto é aceito baseado no número de defeitos em amostras

	7	Muito baixa	O processo é 100% inspecionado manualmente durante o processo
	6	Baixa	O processo é 100% inspecionado manualmente utilizando parâmetros de processo estabelecidos nos protocolos operacionais padrão
	5	Moderada	Controles estatísticos de processo são utilizados e o produto final é inspecionado fora da linha de produção ou processo
	4	Moderadamente elevada	Controles estatísticos de processo são utilizados, existe uma reação imediata para condições fora dos parâmetros estabelecidos
	3	Elevada	Existem procedimentos que tem a capacidade de detecção de falhas
	2	Muito elevada	O processo é 100% inspecionado automaticamente
	1	Com certeza será detectado	O desvio é detectado automaticamente através da calibração, manutenção preventiva ou inspeção do equipamento

Fonte: BAHRAMI; BAZZAZ e SAJJADI, 2012.

3. Número de Priorização de Risco (NPR): Na metodologia tradicional de aplicação do FMEA, o NPR é amplamente utilizado para conduzir o gerenciamento de riscos dentro das suas principais aplicações, inclusive em áreas da engenharia. Em toda falha potencial, os fatores de riscos são definidos como: Severidade (S), que pode ser considerada como a intensidade do resultado de uma falha. A Frequência (F), que é a oportunidade ou probabilidade de um evento acontecer. A Detecção (D), que considera a capacidade de uma falha não identificada de acontecer, devido à dificuldade de detecta-la. Estes três fatores sempre são mesurados em escala de 1 (melhor situação possível) e 10 (pior caso). O NPR comumente é expressado como: **NPR = S * F * D**.

   Uma vez que todos os itens foram analisados e calculados os respectivos valores de NPR, foram sugeridas as ações corretivas para serem implementadas prioritariamente em aqueles riscos com maior valor de NPR. Sendo assim, Naik (2015) na Tabela 5 propõe a escala para priorização do tratamento dos riscos levando em consideração NPR da seguinte forma:

Tabela 5 - Escala de priorização de ações para redução do NPR.

NPR	Nível	Ação
> 300	Alto	Tomar ações imediatas para redução do NPR < = 125
125 - 300	Médio	Avaliar tomar ações para redução do NPR até 125
< 125	Baixo	Tomar ações posteriormente ao tratamento de NPR Alto e Médio

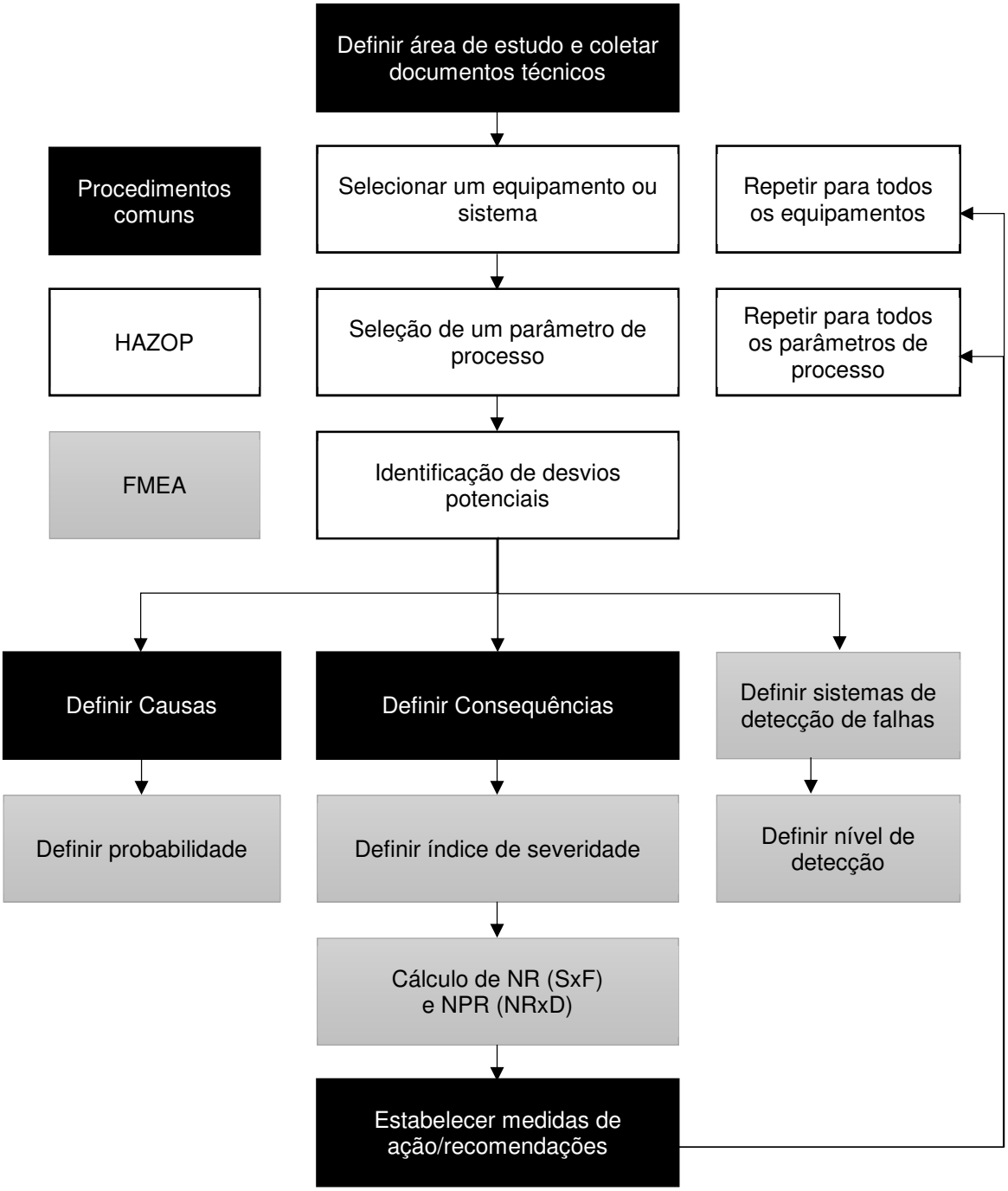
Fonte: NAIK, 2015.

É recomendado que após aplicar as medidas ou ações para controle dos riscos correspondentes, é recomendado reavaliar os índices de Frequência, Detectabilidade e NPR, com o intuito de verificar se os riscos foram reduzidos ou eliminados ou para avaliar quão eficiente a ação corretiva é (XIAO et al., 2011).

4. Análise de cada um dos componentes ou nós: Complementando o ciclo deste estudo, para cada um dos elementos analisados foi necessário repetir os passos 3 a 8 (quando for o caso), até completar a análise do sistema.
5. Recomendações/Ações: foram estabelecidas pelo grupo multidisciplinar com o intuito de reduzir ou eliminar o grau de risco das falhas ou desvios. Para nível elevado de risco as recomendações viraram-se ações, isto é, porque níveis muito elevados de risco não podem ser aceitos até serem completamente corrigidos e garantir segurança tanto ao pessoal operativo, equipamentos, infraestrutura, bem como clientes e requerimentos regulatórios.

Finalmente, a metodologia das ferramentas integradas que foi aplicada na análise do processo de produção de proteínas recombinantes é apresentado na Figura 21, onde pode ser percebida a contribuição de cada ferramenta (HAZOP, FMEA) para estruturar a metodologia integrada.

Figura 21 - Procedimento da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA.



Fonte: O autor, 2017.

3.2 Aplicação da metodologia integrada e elaboração do registro da avaliação de riscos.

Uma vez que a estruturação da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA foi concluída, foi aplicada para a avaliação das operações unitárias consideradas como as mais críticas no processo de produção de proteínas recombinantes da seguinte forma:

1. A equipe multidisciplinar de especialistas foi estabelecida, considerando elementos das áreas de produção, engenharia, qualidade, elétrica, manutenção e validação (JAGTAG, 2017).
2. A equipe multidisciplinar realizou a análise da documentação previamente coletada do sistema, incluindo a análise dos desenhos de tubulação e instrumentação (P&ID), diagramas de processo (PFD), diagramas elétricos e lógicos, protocolos operacionais padrão, manuais de operação, normas e legislação, e qualquer documentação técnica adicional disponível relativa ao sistema.
3. Previamente à aplicação da metodologia integrada o sistema foi analisado para discriminar as etapas mais críticas, visando objetivar a análise dos componentes de maior risco.
4. A metodologia integrada foi aplicada nas operações unitárias consideradas como primordiais para a execução do processo em cada etapa. Assim sendo, a identificação dos desvios das operações baseou-se em desvios do parâmetro esperado (quanto o limite superior e inferior é ultrapassado).
5. A equipe definiu as causas, consequências, calculou a probabilidade, e estabelece o índice da severidade.
6. Foram avaliados os riscos de maior grau e elencado segundo a capacidade do sistema estudado de identificá-los.
7. O grupo elaborou o relatório de análise de risco segundo as considerações a seguir.

Relatórios: os relatórios ofereceram a evidencia da análise de risco do sistema. No caso particular deste trabalho, foram elementos que sustentaram os argumentos da avaliação e permitiram o registro das

recomendações e ações que devem ser aplicadas (caso seja necessário). Na Tabela 6 é apresentado o desenho elaborado e aplicado pelo grupo multidisciplinar para elaboração do relatório da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA.

Tabela 6 - Planilha da metodologia integrada das ferramentas de análise de risco FMEA e HAZOP.

Metodologia Integrada de Análise de Riscos										
ID Empresa/ ID Instituto				**ETAPA**	**Equipamentos envolvidos**					Data:
Responsável				**Operações Unitárias:**						
				Descrição:						
Nó:										
ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles, Salvaguardas	Efeitos	S	F	D	NPR	Recomendações / Observações
1										
2										
3										
.										
.										
n										

Fonte: O autor, 2015.

A estrutura do relatório foi apresentada de forma detalhada considerando todos os itens testados durante a elaboração deste trabalho, tendo em vista que cada um dos componentes do objeto em estudo foram submetidos a uma revisão, com o objetivo de identificar a origem, a criticidade e frequência de ocorrência de cada um deles, as medidas de contenção existentes no sistema, assim como recomendações ou ações corretivas segundo o caso para servir como base na aplicabilidade em outros sistemas similares. As informações geradas nos relatórios serão incorporadas em forma de um Procedimento Operacional Padrão (POP) seguindo a estrutura desse tipo de procedimentos na organização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Descrição do Processo

Com a aplicação da metodologia integrada das ferramentas HAZOP e FMEA, foram identificadas as principais operações unitárias que direta ou indiretamente influenciam na qualidade, eficácia e segurança do processo de produção de biomassa recombinante. Assim, por meio da análise crítica realizada pela equipe multidisciplinar de especialistas, foi possível destacar quais riscos nas operações unitárias, podem gerar impactos negativos consideráveis, tanto para a infraestrutura, para o processo produtivo, bem como para os operadores. Desta forma a apresentação dos dados a seguir, estão agrupadas pelas Operações Unitárias envolvidas nas etapas de processo para produção de biomassa recombinante, uma vez que ao longo do processo produtivo as Operações Unitárias se repetem, o que tornaria a apresentação dos resultados exaustivas, porém levando as mesmas discussões e conclusões em tela.

Para um melhor entendimento da apresentação dos resultados, se faz necessário primeiramente estabelecer as condições esperadas do processo, tais como, volume e temperatura do processo. Ainda que existam outros parâmetros considerados como críticos (pressão, vazão, entre outros), na Tabela 7 estão descritas as condições para as etapas de propagação, biorreação e centrifugação que permitam atender a capacidade produtiva esperada da infraestrutura.

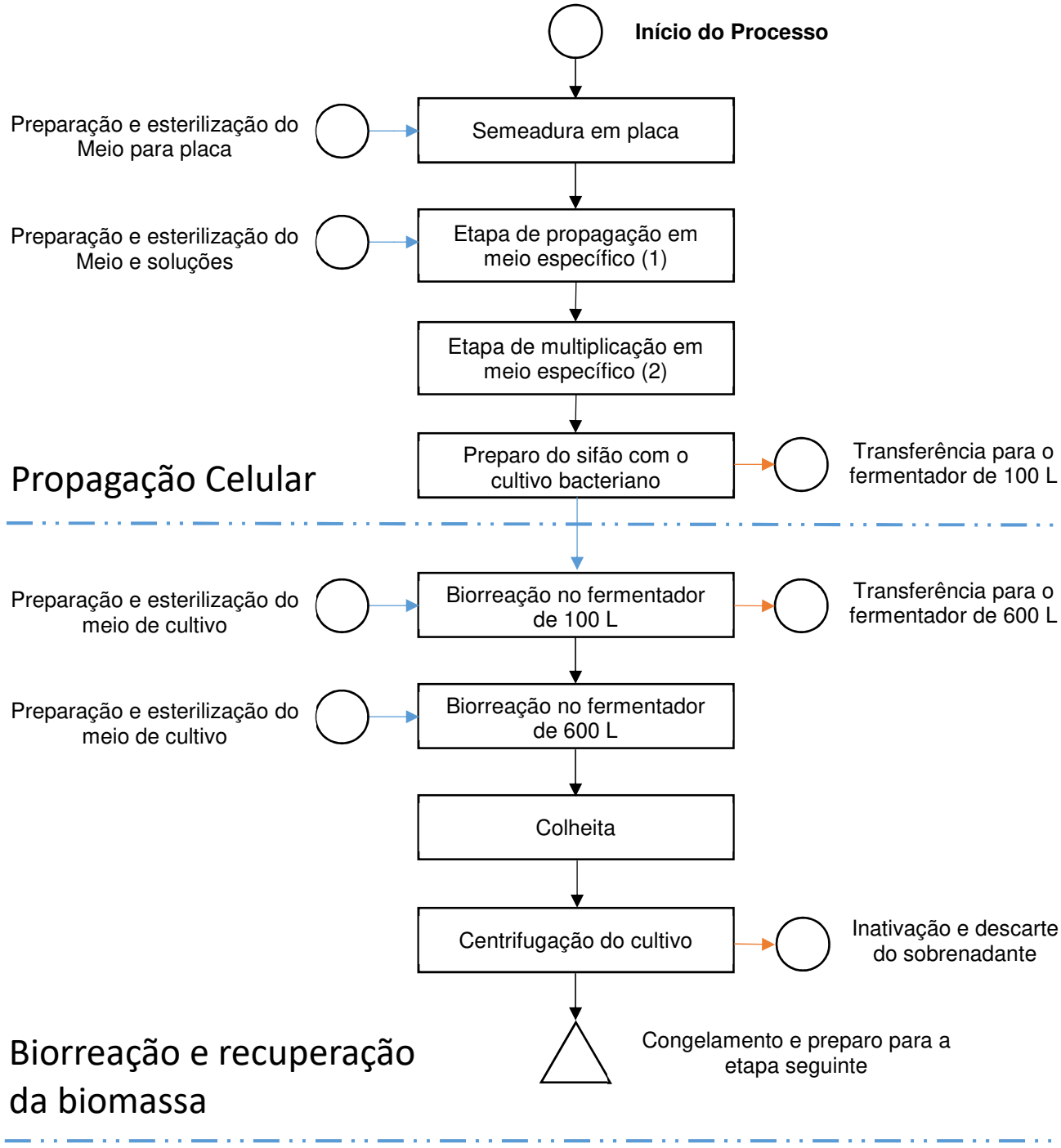
Tabela 7 - Condições de operação do processo de propagação celular, biorreação e centrifugação do cultivo bacteriano segundo a capacidade do sistema.

Etapa	Processo	Volume (L)	Temperatura de Operação (C)
Propagação Celular	Expansão do banco de células	4	37
Biorreação	Biorreação 1 (Pré-Inóculo)	40	37
	Biorreação 2 (Fermentação)	400	37
	Colheita de Cultivo	400	4 a 8
Centrifugação do Cultivo	Centrifugação	8	4 a 8
	Inativação do Sobrenadante	400	121
Todas	Lavagem (CIP)	N/A	90
	Esterilização	N/A	121

Fonte: O autor, 2017.

Após elencar as condições do processo, o procedimento realizado em cada etapa analisada neste trabalho foi desenhado esquematicamente. Para tal fim, foram utilizados como base primeiramente os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs)das etapas de propagação celular e biorreação apresentadas na Figura 22.

Figura 22 - Etapas de geração de biomassa recombinante no sistema de biorreação da planta de procariotos.



Fonte: O autor, 2017.

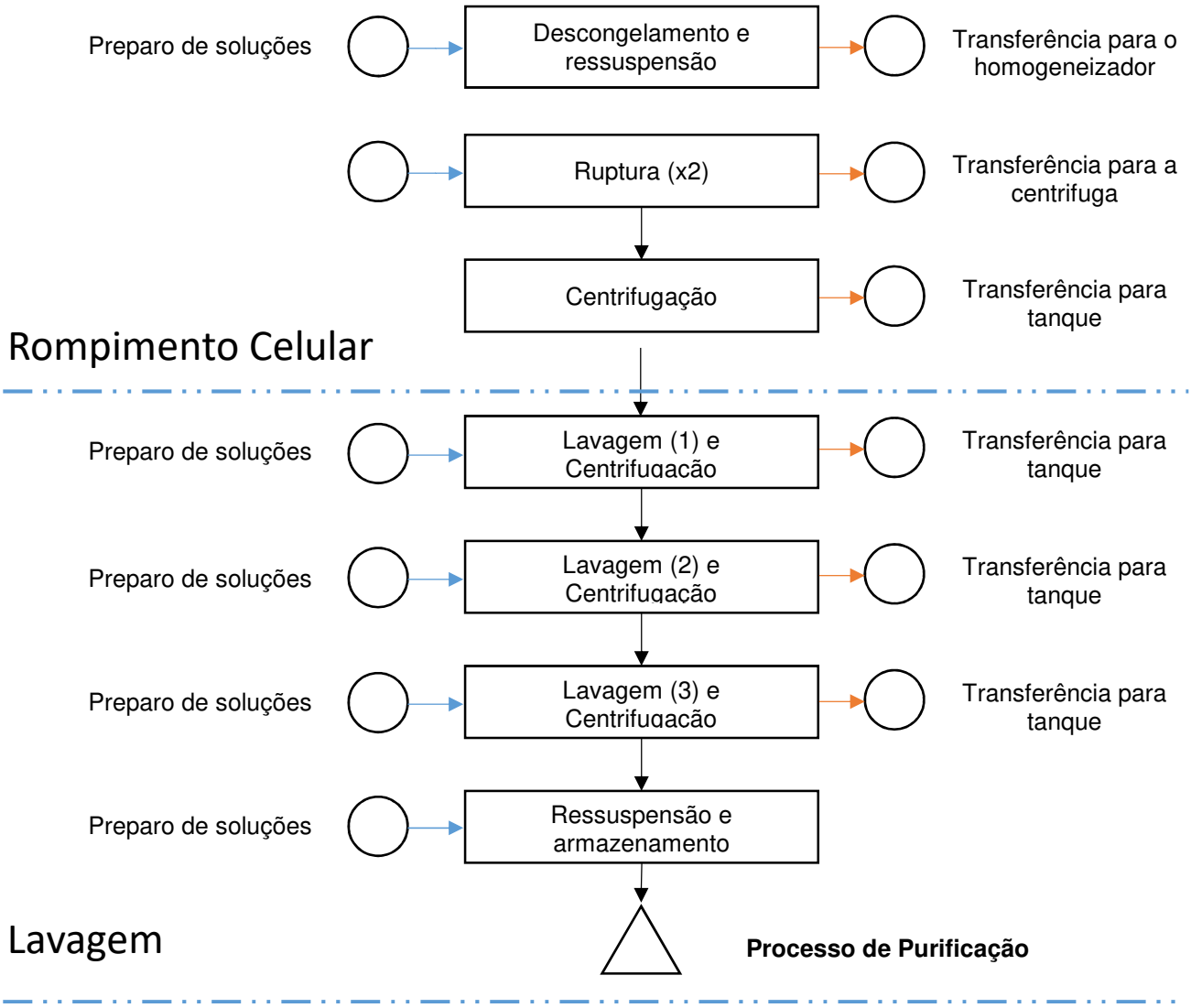
Complementarmente, na Tabela 8, e na Figura 23, estão apresentadas as condições de operação do rompimento celular e lavagem dos corpos de inclusão.

Tabela 8 - Condições de operação do processo de rompimento celular, centrifugação e lavagem dos corpos de inclusão, segundo a capacidade do sistema.

Etapa	Processo	Volume (L)	T. de Operação (C)
Ruptura	Rompimento Celular	< 20	4 a 8
	Colheita de células rompidas	< 20	4 a 8
Lavagem dos Corpos de Inclusão	Centrifugação	< 20	4 a 8
Todas	Lavagem (CIP)	N/A	90
	Esterilização	N/A	121

Fonte: O autor, 2017.

Figura 23 -Etapas de rompimento celular e lavagem dos corpos de inclusão.



Fonte: O autor, 2017.

Como a ferramenta proposta de integração do HAZOP e FMEA mostrou-se exaustiva para todas as combinações possíveis entre palavra-guia e parâmetros de operação, neste capítulo será apresentado um resumo dos resultados obtidos com ponderações que julgamos fundamentais, o relatório detalhado da análise com todos os detalhes encontra-se no Anexo I. Assim, em resposta ao procedimento estabelecido de aplicação da metodologia neste trabalho, foram identificadas oito operações unitárias que foram consideradas como as mais críticas para realização do processo estudado. Na Tabela 9, são apresentadas estas operações unitárias, sinalizando também quais os equipamentos onde são realizadas e em sequência a etapa do processo onde é localizado o equipamento.

Tabela 9 - Identificação das operações unitárias mais críticas utilizadas no processo produtivo de proteínas recombinantes na etapa a montante.

Operação Unitária	Equipamento	Etapas
Agitação	Incubadora com Agitação Orbital Biorreatores de 100 e 600 L Tanque de Colheita de 600 L Tanque de Inativação Tanques - Reatores	Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem dos Corpos de Inclusão
Transferência de Calor	Incubadora com Agitação Orbital Biorreatores de 100 e 600 L Tanque de Colheita de 600 L Freezers Trocadores de Calor Tanque de Inativação Centrífuga Tubular Homogeneizador de Alta Pressão Tanques - Reatores	Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem dos Corpos de Inclusão
Filtração	Cabine de Segurança Biológica Biorreatores de 100 e 600 L Módulo de Fluxo Laminar	Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Centrifugação e Lavagem dos Corpos de Inclusão
Bombeamento	Bomba Peristáltica	Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem dos Corpos de Inclusão
Absorção	Biorreatores de 100 e 600 L	Biorreação
Condensação	Biorreatores de 100 e 600 L	Biorreação
Centrifugação	Centrífuga Tubular	Centrifugação do Cultivo, Lavagem e Recuperação dos corpos de Inclusão
Compressão	Homogeneizador de Alta Pressão	Ruptura Celular

Fonte: O autor, 2017

4.2 Aplicação da Metodologia Integrada de Análise de Risco

Para a apresentação dos resultados, foi utilizado como premissa o conceito que uma operação unitária pode ser definida como nó de estudo, onde é realizada a transformação da matéria. Desta forma na Tabela 10 listam-se as principais operações unitárias (nós), parâmetros e desvios correspondentes, que foram identificados pelo grupo multidisciplinar, e que recorrentemente são aplicadas nos equipamentos ao longo do processo. As operações unitárias foram elencadas utilizando como critério de seleção o envolvimento direto da operação na transformação de matéria em produto. Em casos específicos, foram consideradas as operações unitárias que mesmo não estando em contato direto com os microrganismos (plataforma produtiva utilizada neste processo), são indispensáveis para que uma outra operação crítica possa ser realizada, e no caso dos serviços de apoio (utilidades), garantam a integridade das operações (CIP/SIP), para atendimento a quesitos regulatórios

Tabela 10 - Relação das Operações Unitárias do processo de produção de biomassa recombinante com parâmetros e desvios no processo.

Operação Unitária (Nó)	Parâmetro	Desvio		
Agitação	Velocidade	Não	Menos	Mais
Transferência de Calor	Temperatura	Menos	Mais	
Filtração	Vazão	Não	Menos	Mais
Bombeamento	Volume	Não	Menos	
	Rotação	Menos	Mais	
	Vazão	Não	Menos	Mais
Absorção	QO2	Não	Menos	
Condensação	Temperatura	Mais		
	Vazão	Não	Menos	
Centrifugação	Tempo	Menos	Mais	
	Vazão	Não	Menos	Mais
	Nível	Não	Menos	Mais
Compressão	Pressão	Não	Menos	Mais

Fonte: O autor, 2017

Uma vez que os nós, parâmetros e desvios foram identificados, a metodologia integrada de análise de risco foi aplicada em cada uma das operações unitárias identificadas como nós. A seguinte avaliação apresenta os critérios de seleção dos

parâmetros, causas, consequências, índices de probabilidade considerando a Tabela 12, a severidade conforme a Tabela 14, e detecção seguindo os critérios estabelecidos na Tabela 15, bem como o Número de Priorização de Risco (NPR) relatado na Tabela 16.

Por meio da apresentação dos seguintes resultados, é feita uma compilação geral das considerações independentemente da etapa ou equipamento utilizado para efetuar a operação, de modo que permita a rápida análise dos resultados, evitando a repetição dados obtidos durante a realização deste trabalho. Cabe mencionar que somente em casos particulares, não todos desvios dos parâmetros sinalizados anteriormente foram cumpridos em todas as etapas, nesse caso serão identificados e justificada essa decisão dentro dos resultados. O relatório completo da aplicação das metodologias de análise de risco encontra-se no Anexo I deste trabalho.

4.2.1 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Agitação.

Parâmetro: Velocidade

Critério de seleção: A operação unitária de agitação, é amplamente utilizada em nas etapas do processo estudado, primeiramente como o seu nome indica, a agitação permite a mistura entre componentes do processo, e propícia a distribuição de oxigênio ao longo do biorreator para favorecer a respiração e metabolismo do microrganismo. Este princípio está de acordo com a investigação apresentada por Wang e Zhang (2007), Bakri, Makaeel e Koreih (2011), e Esa et al. (2016), onde os pesquisadores demostraram os impactos da agitação na aeração, e consequentemente no metabolismo em cultivos de microrganismos. Para este trabalho, foi considerado que a operação de agitação favorece a eficiência de transferência de calor durante o processo, e permite o melhor desempenho dos ciclos CIP/SIP, premissa também demostrada no trabalho de Chisti e Moo-Young (1994), onde os autores estabelecem que a agitação favorece a transferência de calor em biorreatores industriais, melhorando assim o desempenho dos sistemas de lavagem (CIP).

Palavras-guia: Os potenciais desvios que podem acontecer para este parâmetro são NÃO (sem movimento), MENOS que é o parâmetro inferior ao esperado, e MAIS, que é a operação acima do limite estabelecido.

Causas: As causas podem variar segundo a etapa do processo, no entanto, de forma geral podem ser classificadas como:

- Falhas Humanas: Parâmetro de operação e/ou posicionamento incorreto do agitador.
- Falhas do Equipamento: Falhas do motor, falha do controlador

Consequências: Dentre as principais consequências com problemas de agitação, destacam-se a baixa distribuição de oxigênio no biorreator, e que de acordo com Gibbs e Seviour, (1996)e Kouda, Naritomi, Yano, Yoshinaga (1997),pode ser esperado baixo crescimento celular, e consequentemente baixa geração de produto. Também foi definido que este tipo de desvio vai conduzir a interrupção temporária ou definitiva do processo. Por outro lado, desvios na agitação podem dificultar a homogeneidade térmica nos biorreatores e tanques durante o processo, e falhas na lavagem e esterilização (contaminação e não conformidades).

Probabilidade, Severidade, Detecção e NPR: Tendo que cumprir as BPF durante operação, qualquer desvio que possa afetar o processo de esterilização é considerado como CRÍTICO. A probabilidade de ter um desvio total na função é INCOMUM e severidade MUITO ALTA, e desvios onde o parâmetro é inferior ao estabelecido para o processo, é <1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS com severidade MODERADA. Já no caso de o desvio ser superior ao parâmetro de processo, a severidade é BAIXA, e a sua probabilidade é considerada como INCOMUM. No sistema existem diversos sensores e medidores de vazão e pressão, que permitem identificar falhas ou variações na velocidade, como o tacômetro em linha, por tanto, a detecção é considerada como MUITO ELEVADA.

Na Tabela 11 são apresentados o nível de risco e o número de priorização de risco dos desvios do parâmetro.

Tabela 11 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro velocidade na operação unitária de Agitação.

Etapa: Propagação Celular						
Equipamento: Incubadora com agitação orbital						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Não	Muito Alta	Incomum	Não desejável		Elevada	Baixo	
Menos	Moderada	< 1 em 10 processos	Não desejável		Elevada	Baixo	
Mais	Moderada	< 1 em 10 processos	Não desejável		Elevada	Baixo	

Etapa: Biorreação					
Equipamento: Biorreator de 100 e 600 L					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Crítica	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Baixa	Incomum	Aceitável	Muito Elevada	Baixo
Equipamento: Tanque de Colheita					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Crítica	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Baixa	Incomum	Aceitável	Muito Elevada	Baixo
Etapa: Centrifugação do Cultivo					
Equipamento: Tanque de Inativação					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito Alta	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Menos	Moderada	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Moderada	Incomum	Aceitável	Muito Elevada	Baixo
Etapa: Rompimento Celular					
Equipamento: Tanques de Processo					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito alta	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Menos	Muito alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Muito alta	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Etapa: Centrifugação e Lavagem					
Equipamento: Tanques de Processo					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito alta	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Menos	Muito alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Muito alta	Incomum	Não desejável	Muito Elevada	Baixo

Fonte: O autor, 2016.

Como pode ser observado na Tabela anterior, o NPR resultante do nó da operação unitária de agitação, segue o mesmo perfil de risco e NPR entre as etapas do processo, independentemente do equipamento onde a operação é realizada. Este fenômeno pode ser explicado através do alto nível de detecção, automação e controle do sistema e monitoramento do processo, proporciona maior confiabilidade no sistema e consequentemente altos níveis de detecção para os desvios. Particularmente, nas operações ou equipamentos nos quais a interação homem-máquina é necessária, Carlson (2014) sugere que o índice de detecção seja inferior em comparação com processos automatizados.

Este é o caso da Incubadora com Agitação Orbital, onde a operação de agitação não segue o mesmo princípio de agitação que os tanques agitados utilizados em outras etapas do processo, além de que, a capacidade de monitoramento e controle são levemente inferiores a estes equipamentos (Freedman, 1970). Adicionalmente, foi observado que o nível de risco para este nó, seguiu tendência considerada como não desejável. Ainda que na maioria dos desvios identificados a probabilidade calculada foi considerada como baixa, foi observado que o índice de severidade dos desvios afetou diretamente o nível de risco. Este fenómeno é relatado por Ristic (2013) e Moatari-Kazerouni, Chinniah, Agard (2015), em que os autores estabeleceram a relação entre índices elevados de probabilidade e severidade, e os impactos que geram no nível de risco.

Assim, de acordo com Barrera e Mayfield (2013), e Palomares, Estrada-Mondaca e Ramirez (2004), os produtos gerados por biomassas recombinantes são de alto valor agregado, portanto se consideramos que as perdas ocasionadas pela baixa eficiência na agitação são diretamente proporcionais à baixa eficiência do processo, a eficiência desta operação unitária tem que ser mantida constante ao longo do processo.

No caso dos biorreatores, segundo Chisti e Jauregui-Haza (2002), a elevada agitação pode melhorar a capacidade de transferência de oxigênio no sistema, que sob controle, o desvio da agitação ser moderadamente superior ao parâmetro de processo não carrearia impactos consideráveis no sistema.

4.2.2 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Transferência de Calor

A segunda operação unitária do processo identificada como crítica pelo grupo multidisciplinar, foi a transferência de calor. Esta operação, é praticamente utilizada em todos os sistemas e equipamentos do processo (da mesma forma que a agitação). A seguir estão listados os critérios seguidos pelo grupo para estabelecer o nível de risco e calcular o NPR.

Parâmetro: Temperatura

Critério de seleção: A escolha deste parâmetro é uma função direta da reincidência em diversas operações ao longo do processo, por exemplo, para manter as condições de operação dentro dos parâmetros favoráveis para promover o metabolismo do microrganismo como é sugerido por Gonthier et al. (2001), Nguyen (2006), e Tesařová e Hrady (2011). De igual forma Cappia (2004) sinaliza a importância deste parâmetro na manutenção dos parâmetros necessários para a limpeza (CIP), e durante os ciclos de esterilização do sistema (SIP).

Palavras-guia: Neste caso, os desvios são exclusivos para a etapa que está sendo avaliada. Para o processo de biorreação, o desvio pode ser MAIS quando o parâmetro excede o limite aceitável do processo, e MENOS, quando o parâmetro é inferior ao estabelecido, tanto para o processo, como para o ciclo de lavagem e esterilização.

Causas: Durante a definição das causas, a equipe multidisciplinar concordou com o princípio de Dehran (2017), no qual, é explicado que as causas que poderiam dar origem a desvios no parâmetro da temperatura, são divididas em aquelas que indiretamente provocam desvios do parâmetro desejado(fatores externos),e naquelas que são originadas por problemas operacionais. Os mesmos problemas foram previamente identificados por Gulley (1996) e Gibbard (1997), onde os autores identificaram os impasses característicos no funcionamento dos trocadores de calor em plantas industriais, e estabeleceram estratégias que permitam resolve-los e inclusive melhorar o desempenho na transferência de calor. Desta forma, as principais causas foram classificadas como:

- Externas: Segundo o estudo de falhas em trocadores de calor utilizados em refinarias apresentado por Akpa e Okoroma (2012), a falta de fornecimento,

ou utilidades fora dos parâmetros de processo, são a fonte externa principal de desvios em trocadores de calor.

- Operacionais: Falhas das válvulas na entrada da utilidade, e de acordo com Debab et al. (2011) a baixa agitação no caso de tanques e biorreatores agitados.

Consequências: A consequência direta desse parâmetro, sem importar o equipamento utilizado, pode ser definida como desvios da faixa de operação do parâmetro de temperatura (superior ou inferior segundo a etapa do processo). Entretanto, no caso especifico do sistema avaliado neste trabalho, destacam-se como mencionado anteriormente, o baixo crescimento celular, baixa geração de produto, e interrupção temporária ou definitiva do processo. Também pode dificultar a homogeneidade térmica no biorreator durante a lavagem e esterilização, que conforme os princípios de esterilização sinalizados por Dion e Parker (2013), haverá possibilidade de contaminação, que precederá a geração de não conformidades.

Probabilidade, Severidade, Detecção e NPR: As não conformidades, contaminação e morte celular, foram definidas como severidade CRÍTICA segundo os critérios estabelecidos na metodologia. Espera-se que a probabilidade na maioria das etapas, seja < 1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS. Na identificação do nível de detecção, foi percebido que na entrada e na saída da camisa dos biorreatores, nos tanques e equipamentos de grande porte, existem sensores de temperatura. Da mesma forma, existe um sensor que permite mensurar a temperatura dentro do tanque (imerso no cultivo).

Estes sensores, em conjunto com o sistema de alarmes e processos recorrentes de validação, permitiram definir a detecção como MUITO ELEVADA. Na Tabela 12 mostra-se o nível de risco da operação unitária e o NPR.

Tabela 12 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Temperatura na operação unitária de Transferência de Calor.

Etapa: Propagação Celular					
Equipamento: Incubadora com agitação orbital					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável	Elevada	Baixo
Mais	Muito Alta	< 1 em 4 processos	Não desejável	Elevada	Baixo

Etapa: Biorreação					
Equipamento: Biorreatores de 100 e 600 L					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Equipamento: Trocadores de Calor					
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Equipamento: Tanque de Colheita					
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Equipamento: Freezers					
Mais	Muito Alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo

Etapa: Centrifugação do Cultivo					
Equipamento: Centrífuga					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo
Equipamento: Tanque de Inativação					
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo

Etapa: Ruptura Celular					
Equipamento: Homogeneizador de Alta Pressão					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo
Equipamento: Tanques de Processo					
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Equipamento: Freezers					
Mais	Muito Alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo

Etapa: Centrifugação e Lavagem					
Equipamento: Centrífuga					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Elevada	Baixo
Equipamento: Tanques de Processo					
Menos	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo
Mais	Crítica	< 1 em 10 processos	Não desejável	Muito Elevada	Baixo

Fonte: O autor, 2016.

Conforme esperado, desvios fora da faixa de operação do parâmetro de temperatura, estão na região de elevada severidade. Isto é explicado no trabalho de Semenov et al. (2007), no qual é explicada a influência de variações na temperatura no crescimento das bactérias. Portanto, qualquer operação envolvendo este tipo de microrganismos, tem que ser mantida dentro dos limites de temperatura que garantam o correto funcionamento do metabolismo bacteriano.

Da mesma forma, desvios que representam o sentido inverso da função esperada em um equipamento ou sistema (exemplo: maior temperatura nos freezers, menor temperatura para inativação, lavagem e esterilização, etc.), seguem o mesmo critério de severidade. Assim, através da matriz de risco, pode ser percebido que o nível de risco dos desvios desta operação unitária, são considerados como não desejáveis. Contudo, os dispositivos de controle e monitoramento da temperatura que compõem o sistema, permitem uma rápida detecção de falhas e inclusive propicia tomar ações em etapas previas às falhas, nesse sentido Willey (2014), considera que independentemente do nível de risco, o NPR será diretamente beneficiado pelos dispositivos de segurança, controle e monitoramento.

4.2.3 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Filtração

A operação unitária de filtração no sistema estudado, tem como objetivo garantir a esterilidade dos gases utilizados no processo, tais como, ar comprimido para pressurização dos tanques, ar para secagem, ar para a mistura ar-oxigênio para os biorreatores (o O_2 é considerado estéril), e de acordo com Bendtsen (2000) e

Hakalehto (2015), gases de exaustão na saída dos biorreatores. A seguir são retratados os critérios pelos quais este nó foi considerado como crítico, o nível de risco e o NPR.

Parâmetro: Vazão (gases)

Critério de seleção: A filtração de gases de processo utilizados para pressurização do sistema, e para secagem durante limpeza e esterilização, é necessária para garantir que estes elementos não possuam contaminantes (RIOS, 2003).A equipe multidisciplinar também definiu que a filtração permite a recuperação de partículas, ou células nos gases de exaustão na saída do sistema, em cumprimento com a legislação vigente (ISPE, 2005 e BRASIL, 2010).

Palavras-guia: Segundo a metodologia utilizada neste trabalho, existem três tipos de desvios característicos para este parâmetro, os quais são, NÃO (falta total da função ou parâmetro), MENOS e MAIS, que representam a execução da operação fora dos limites de processo.

Causas: A operação da filtração no sistema estudado é comumente realizada utilizando filtros HEPA, garantindo assim, o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação para produção de produtos farmacêuticos para uso humano mencionadas por Gouveia, Rijo, Gonçalo e Reis (2015). É por esse motivo que os principais desvios são relacionados com problemas nesses dispositivos, como: problemas operacionais durante a manipulação dos filtros, problemas na infraestrutura do material, e finalmente as humanas. A seguir são detalhados os desvios mais comuns.

- Materiais: Segundo Greiner (1990) e Gutacker (1991) as falhas na capacidade de filtração é comumente ocasionada por saturação ou rompimento dos filtros.
- Operacionais: Falhas das válvulas, obstruções nas tubulações, aumento na pressão do sistema
- Humanos: Esquecimento ou instalação errada dos filtros.

Consequências: Como principais efeitos, pode-se esperar que a correta secagem do sistema nos ciclos CIP/SIP não será concretizada, o produto não será transferido entre etapas, ou pode demorar mais tempo que o esperado, não conformidades, falha na retenção de contaminantes, entre outros.

Probabilidade, Severidade, Detecção e NPR: Ainda existindo diferentes critérios que podem ser considerados para definir a severidade destas falhas, o descumprimento regulatório é o mais relevante e tem que ser de considerado como

CRÍTICO. A equipe multidisciplinar determinou que a probabilidade de ter uma falha total do parâmetro é incomum, já para valores inferiores, ou superiores aos limites do parâmetro, a probabilidade é inferior a <1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. Complementarmente, antes de começar o processo, são realizados testes de integridade do filtro, existem medidores de vazão de ar na entrada, e na saída do ar de processo e dos gases de exaustão, e sensores de pressão.

Portanto, a detecção pode ser considerada como ELEVADA. Na Tabela 13 é apresentado o nível de risco e NPR dos desvios da operação unitária nas etapas de processo estudadas neste trabalho.

Tabela 13 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Filtração.

Etapa: Propagação Celular					
Equipamento: Cabine de Segurança Biológica					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Menos	Muito alta	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Mais	Muito alta	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio

Etapa: Biorreação					
Equipamento: Biorreatores de 100 e 600 L					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Crítica	Incomum	Não desejável	Elevada	Baixo
Menos	Crítica	< 1 em 4 processos	Não desejável	Elevada	Médio
Mais	Crítica	< 1 em 4 processos	Não desejável	Elevada	Médio
Equipamento: Módulo de Fluxo Laminar					
Não	Menor	< 1 em 10 processos	Aceitável	Baixa	Baixo
Menos	Menor	< 1 em 4 processos	Aceitável	Baixa	Baixo
Mais	Menor	< 1 em 4 processos	Aceitável	Baixa	Baixo

Etapa: Centrifugação do Cultivo					
Equipamento: Módulo de Fluxo Laminar					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito alta	<1 em 10 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Mais	Muito alta	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio

Etapa: Rompimento Celular
Equipamento: Não se aplica, a operação é aberta e a transferência de produto é realizada por bombeamento peristáltico.

Etapa: Centrifugação e Lavagem					
Equipamento: Módulo de Fluxo Laminar					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito alta	< 1 em 10 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio
Mais	Muito alta	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Médio

Fonte: O autor, 2016.

Após obter os resultados da análise de risco para a operação unitária filtração, facilmente pode ser observado o alto nível de risco que caracteriza essa operação. Este fato pode ser explicado por meio do entendimento do funcionamento dos sistemas de filtração apresentado por Berovic (2009), em que a retenção de partículas ou microrganismos, garantem a qualidade esperada do produto nestes dispositivos ao longo do processo. Já no caso do modulo de fluxo laminar na etapa de biorreação, as operações realizadas sob este sistema, não estão diretamente relacionadas com a manipulação do produto.

Ainda que Ashrae (2008), Jaroszczyk, Fallon e Schuartz (2008), e Cen (2012) estudaram a gravidade dos impactos gerados por falhas na filtração para recuperação de partículas, para o nosso trabalho a severidade de desvios foi considerada como baixa. Esta decisão somente pode ser respaldada se temos em mente que este equipamento em particular, é utilizado para remoção de partículas do ambiente durante a realização dos controles de processo, separação de amostras, identificação de bactérias Gram-negativas, e ajuste de sensores de pH, condutividade, entre outros, dentro de um ambiente controlado.

Considerando que a probabilidade de falhas neste sistema é semelhante entre as etapas, o nível de risco para a operação unitária filtração foi identificado como não desejável, e para o módulo da biorreação como aceitável. Após análise dos sistemas, a equipe concluiu que a realização de testes de integridade nos filtros sugerida por Meltzner e Jornitz (2008) e Rideal (2009), é a única forma de identificar se os filtros estão comprometidos. No entanto, o teste de integridade somente pode ser realizado quando o equipamento não está em operação (entre lotes). Sendo assim, concluiu-se

que existe uma clara vulnerabilidade durante a operação, e é necessário aplicar procedimentos ou mecanismos que permitam melhorar a capacidade de detecção de falhas durante o processo. Desta forma espera-se garantir que a operação seja executada corretamente e dentro dos parâmetros de qualidade e segurança.

4.2.4 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Bombeamento

A análise do processo por parte da equipe multidisciplinar, concordou com o princípio apontado por Jørgensen e Lambert (2008), em que o bombeamento peristáltico é uma das operações unitárias mais utilizada nos processos biofarmacêuticos. Ainda que, o equipamento utilizado para realizar esta operação possa ser considerado como simples tecnologicamente falando, o volume de produto processado no processo estudado, varia de 50 ml até 400 L. Este fato serviu como argumento para a equipe multidisciplinar em realizar uma avaliação detalhada dos riscos envolvidos nesta operação. Os parâmetros que foram avaliados para este sistema foram volume, rotação e vazão segundo sinalizado por Loudin (2007). Visto que as bombas peristálticas utilizadas no processo têm a mesma estrutura tecnológica sem importar a capacidade, e em algumas etapas o modelo utilizado é o mesmo, o nível de risco e cálculo do NPR foi considerado representativo para todo o processo. Portanto, não houve necessidade de separar no relatório a análise por etapa (como foi feito anteriormente). Neste caso, o nível de risco e NPR representa a análise de risco para cada etapa do processo onde a operação de bombeamento é utilizada. A seguir é apresentada a análise de risco resultante da avaliação da operação unitária realizada pelo grupo.

a) Parâmetro: Volume (nível)

Critério de seleção: A principal função do bombeamento é favorecer a transferência de produto entre etapas, portanto, mudanças no volume transferido pode ser resultado de problemas no bombeamento. Complementarmente, na etapa de homogeneização, queda no volume pode afetar o funcionamento do homogeneizador de alta pressão (Mohr, 1987). Desta forma o volume é um parâmetro fundamental a ser avaliado.

Palavras-guia: A equipe determinou que os desvios mais comuns são, NÃO (falta de), e MENOS (menor volume), neste caso o desvio maior não se aplica, uma vez que

o limite do volume seria a capacidade interna do flexível utilizado para a transferência como sinalizado por Takagi e Balmforth (2011) na avaliação do funcionamento de bombas peristálticas com mangueiras flexíveis na manipulação de líquidos viscosos.

Causas: Desvios no volume de liquido dentro do flexível (mangueira), são consequência somente de falhas na qualidade dos materiais ou falhas operacionais.

- Operacionais: Não existe cultivo no sifão ou tanque, bolhas de ar.
- Materiais : Rompimento, obstrução dentro do flexível.

Consequências: Como principal consequência de operar com volume inferior do esperado, foi considerado o incremento no tempo da operação. Por outro lado, Kapoor e Gupta (2003), estabelecem que a principal característica das salas limpas, é manter os parâmetros de temperatura e humidade em níveis baixos, para evitar crescimento de microrganismos. Assim, Radhakrishnamacharya e Murty (1993) e Bhatt, Medhavi e Gupta (2016), sugerem que existe uma potencial perda de temperatura na solução dentro do flexível a causa do ambiente. Este fenómeno pode ser mais significativo se é considerado o baixo nível de liquido no sistema. Assim, pode-se esperar que a operação seja interrompida até os impactos no produto serem avaliados.

NPR: A severidade torna-se ALTA a razão da falta de produto dentro do flexível durante a operação de transferência, mas, com probabilidade INCOMUM. Por outra parte, para volume inferior ao esperado, a severidade é MODERADA, mas, com a probabilidade de acontecer < DE 1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. Entretanto, o volume de liquido dentro dos recipientes e tanques com produto é mensurado com balanças ou células de carga, isto permite o monitoramento em linha da variação de peso/volume, e por consequência possibilita a avaliação imediata da capacidade da transferência pelo flexível. Para Shieh et al(2001),Souza e Cabral (2008), e Ullah (2015), sensores e medidores de vazão em linha oferecem a confiabilidade em que um processo é monitorado constantemente, portanto, a partir da análise dos diagramas de instrumentação do sistema foram identificados vários de estes componentes, permitindo definir que a capacidade de detecção de desvios neste parâmetro é ELEVADA. Na Tabela 14, é apresentado o nível de risco e NPR para este parâmetro.

Tabela 14 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Volume na operação unitária de Bombeamento.

Etapa: Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem					
Equipamento: Bomba Peristáltica					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Não	Muito Alta	Incomum	Não desejável	Elevada	Baixo
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável	Elevada	Baixo

Fonte: O autor, 2016

b) Parâmetro: Rotação

Critério de seleção: Segundo Elabassi, Bergstrom e Brown (2011),a velocidade da operação de transferência do produto depende diretamente da velocidade de rotação dos rolos da bomba peristáltica, portanto, a equipe multidisciplinar determinou a necessidade de avaliar os potenciais riscos dos desvios para este parâmetro.

Palavras-guia: A escolha de desvios foi realizada considerando desvios do parâmetro esperado, portanto foram selecionados os desvios MENOS e MAIS para os limites operacionais estabelecidos.

Causas: Existem duas classificações que podem dar origem aos desvios, primeiramente os desvios originados por erro humano, e os desvios originados por falhas do equipamento, a seguir são citadas as principais causas:

- Humanos: A equipe concluiu que falhas humanas durante a colocação errada do flexível dentro da bomba é a principal causa dos desvios, e que segundo Moscato et al (2008), pode resultar em maior resistência para o flexível e correto funcionamento do motor.
- Equipamento: A expertise da equipe, permitiu concluir que falhas no motor, e falhas no inversor de frequência, afetam diretamente a capacidade de rotação das bombas. Uma conclusão similar foi estabelecida por Du, Ye, Wu e Zhou (2009) na análise do funcionamento de uma bomba peristáltica com um motor magnético onde falhas do motor e elétricas interferem com a capacidade de rotação.

Consequências: como principais consequências, a equipe multidisciplinar concordou com Pagar e Verade (2016), e Swaminathan et al. (2013), em que o aumento de esforço no motor (menor rotação) pode ser esperado, e provavelmente aumento no tempo de transferência do produto. Quando o parâmetro for superior ao necessário pode-se perder o controle da transferência do produto.

NPR: Quando o parâmetro de processo não for atingido a severidade do desvio é MODERADA, e reflete diretamente em outros parâmetros como, volume e vazão. De forma similar, quando o parâmetro for superior ao estabelecido, a severidade do desvio é considerada como MODERADA, dado que poderá se perder o controle da velocidade de transferência de produto.

Em ambos os desvios, a probabilidade foi estimada como INCOMUM, mas com potencial de acontecer. Finalmente, o fato de contar com indicadores elevados, a validação de sistemas, e o monitoramento ao longo do processo, é possível que os desvios possam ser rapidamente identificados, dando como resultado, que a detecção seja ELEVADA. O resultado da análise é apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Rotação na operação unitária de Bombeamento.

Etapa: Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem						
Equipamento: Bomba Peristáltica						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Menos	Moderada	Incomum	Aceitável		Elevada	Baixo	
Mais	Moderada	Incomum	Aceitável		Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

c) Parâmetro: Vazão

Critério de seleção: Da mesma forma que com os parâmetros anteriores, espera-se que o sistema opere dentro dos parâmetros estabelecidos, dentre os quais, Berg et al.(2013) e Ghare (2013), estabelecem que o parâmetro vazão, é fundamental para garantir a correta operação e bom rendimento do processo. Esse foi o motivo pelo qual este parâmetro foi escolhido.

Palavras-guia: Tendo em conta a experiência da equipe multidisciplinar e trabalhos semelhantes (DE LA Oet al., 2013), os desvios característicos deste parâmetro foram: NÃO (falta de), MENOS e MAIS.

Causas: Uma vez que este parâmetro mantém relação direta com os parâmetros volume e rotação, foram estabelecidas as seguintes causas para os desvios:

- Operacionais: Falta de cultivo no recipiente (tanque), bolhas de ar.
- Equipamento: Falhas no motor e falhas no inversor de probabilidade.

- Materiais: Rompimento e/ou obstrução no flexível é um problema comum identificado nos processos de bombeamento peristáltico (WATSON-MARLOW, 2013).

Consequências: Do mesmo modo que nos parâmetros anteriores, as principais consequências são, aumento no tempo de transferência do cultivo, perda de produto, e perda de controle da velocidade na operação de transferência.

NPR: A severidade do desvio total da função é considerada como MUITO ALTA, mas a probabilidade é INCOMUM com potencial de acontecer. No entanto, se o parâmetro for inferior ao estabelecido a severidade é MODERADA, e a probabilidade de acontecer< 1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. Finalmente, se o desvio for superior, a severidade é considerada como MUITO MENOR, mas, com probabilidade INCOMUM de acontecer. Verificamos novamente que a ELEVADA detecção de desvios no sistema permite estabelecer um NPR menor. Este fato e demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Bombeamento.

Etapa: Propagação Celular, Biorreação, Centrifugação do Cultivo, Ruptura Celular, Centrifugação e Lavagem						
Equipamento: Bomba Peristáltica						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Não	Muito Alta	Incomum	Não desejável		Elevada	Baixo	
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável		Elevada	Baixo	
Mais	Muito Menor	Incomum	Aceitável		Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

Foi observado que os potenciais desvios nos parâmetros da operação unitária, são semelhantes entre sim. Isto pode ser explicado através da análise das equações que permitem o entendimento do bombeamento peristáltico (RACHID; OUAZZANI, 2008, NEKRASOV, 2016). Desta forma, é possível entender a associação que existe entre os parâmetros do nó, onde um desvio de qualquer um deles, pode ser a causa ou consequência dos outros, por exemplo baixa velocidade de rotação resultaria em baixa vazão (que são desvios de parâmetros diferentes). Esta premissa pode ser utilizada durante a qualificação do equipamento para reduzir o número de análises e facilitar o processo de detecção de falhas.

No que se referente ao nível de risco, foi percebido que falhas conduzem a efeitos de severidade considerável na maioria dos casos. Estas severidades, em conjunto com a probabilidade de eventos, dão como resultado níveis de risco elevados, que segundo Samaraj e Thiyagarajan (2014) e Ohman et al. (2017) precisam de resolução até serem reduzidos. Contrário ao esperado, o nível de detecção de desvios estabelecido pela equipe multidisciplinar, não foi determinado a partir da capacidade das bombas peristálticas em detectar falhas ou desvios. Esta decisão baseou-se na análise sistêmica do processo sugerida por Cicek e Turan. (2010), onde medidores de vazão instalados antes ou depois das bombas, medidores de nível ou volume nos tanques, e qualquer dispositivo instalado nos equipamentos utilizados antes ou depois da operação de bombeamento, permitem identificar as falhas na operação unitária.

4.2.5 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Absorção

Ainda que a capacidade de absorção de oxigênio é um fenômeno que depende diretamente do metabolismo do microrganismo e condições ambientais (YASID, 2013), diversos pesquisadores mostraram interesse no entendimento da capacidade de absorção de oxigênio por parte dos microrganismos (DAWES; RIBBONS, 1964, McDANIEL; BAILEY; ZIMMERLI, 1965, HARRISON; PIRT, 1967) como base do entendimento do metabolismo celular. Desta forma, a equipe multidisciplinar julgou conveniente que este fenómeno fosse considerado como um nó a ser estudado. Em outras palavras, de acordo com Karimi et al. (2013), foi observado que a absorção de oxigênio por parte da célula, é profundamente beneficiada pela harmonização de outras operações unitárias, tais como a agitação, e por fatores como a concentração de oxigênio dissolvido dentro do biorreator, geometria do tanque, etc. A seguir, são apresentadas as considerações que permitiram estabelecer o nível de risco e NPR desta operação unitária.

Parâmetro: **Q_{O_2}**(velocidade especifica de respiração)

Critério de seleção: De acordo com Moutafchieva, Popova, Dimitrova e Tschaoushev (2013), se houver um, ou mais desvios no parâmetro que possam afetar velocidade especifica de respiração, poderá ser observado como resultado o baixo rendimento

do processo. Visto que, o sistema foi projetado para favorecer o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo, espera-se que este parâmetro seja mantido constante ao longo processo, e assim favorecer a multiplicação do microrganismo e geração de produto (biomassa recombinante).

Palavras-guia: Após consenso, a equipe multidisciplinar determinou que os desvios mais prováveis de acontecer são, a falta total do parâmetro, e operação inferior ao parâmetro esperado, definidos pelas palavras NÃO e MENOS.

Causas: Existem três categorias que podem dar explicação aos desvios, aqueles definidos como externos, onde a falha encontra-se fora os limites de estudo, os operacionais, e os de processo.

- Externos: Falta da utilidade (O_2 e Ar).
- Operacionais: Vazamentos e falhas na operação das válvulas na linha.
- Processo: Alta concentração celular - maior consumo de O_2, critério respaldado por Kirk e Szita, (2013), onde maior volume do meio dentro do biorreator, é proporcional com a baixa densidade celular.

Consequências: Como mencionado anteriormente, a atividade metabólica do microrganismo depende diretamente da respiração celular, assim, como consequências podemos considerar os eventos relatados por Garcia-Ochoa, Gomez, Santos e Merchuk (2010), onde a deficiência de oxigênio pode ocasionar a morte celular, baixo crescimento, baixa produção produto, e finalmente a interrupção temporária, ou no pior caso, definitiva do processo.

NPR: Levando em conta as consequências anteriormente mencionadas, a falta total da função tem severidade MUITO ALTA, mas, se tratando principalmente de falhas alheias ao processo, a probabilidade é de <1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS. Da mesma forma, quando o parâmetro é inferior ao esperado, a severidade das consequências é MUITO ALTA, e se espera que aconteça em < 1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. Em contrapartida, o alto nível de controle e automação do sistema, que conta com sensores de oxigênio, sistema automático de controle de válvulas, sensores se nível, etc., permite estabelecer o índice de detecção como MUITO ELEVADO. Na Tabela 17 é apresentado o nível de risco dos desvios do parâmetro e o número de priorização de risco.

Tabela 17 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro **QO2** na operação unitária de Absorção.

Etapa: Biorreação						
Equipamento: Biorreatores de 100 e 600 L						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**
Não	Muito Alta	< 1 em 10 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo
Menos	Muito alta	< 1 em 4 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo

Fonte: O autor, 2016.

A equipe multidisciplinar reforçou o argumento estabelecido por especialistas, no qual as causas que dão origem as falhas não estão diretamente relacionadas com o metabolismo do microrganismo, e sim das condições da operação ou processo (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Como é bem sabido, a capacidade da célula recombinante em expressar proteínas, depende das modificações genéticas da célula utilizada(ROSANO; CECCARELLI, 2014 e JIA; JEON, 2016). Sendo assim, a equipe chegou a um consenso em que, se for identificado um baixo crescimento microbiano ou baixa expressão de proteínas, e as causas mencionadas anteriormente não foram concretizadas, novas causas deverão ser consideradas. A aplicação de conceitos de biologia molecular devem de ser consideradas como potencial explicação a desvios no parâmetro, e a análise de risco precisará ser ampliada. No que se refere a análise de risco da operação unitária, novamente a alto nível de severidade e a probabilidade, definiram que há necessidade de estabelecer medidas que permitam a sua redução. Entretanto, o conjunto da automação, controles e sistema de monitoramento, evita que, ainda sendo necessário, o tratamento de desvios não seja prioritário.

4.2.6 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Condensação

O consenso geral da equipe considerou necessária a análise da operação unitária de condensação com a premissa de atender quesitos de biossegurança, e por conseguinte atendimento estatutos regulatórios e/ou normativos (BRASIL, 2010). A instalação do condensador nos biorreatores analisados neste trabalho, foi idealizada para recuperar as partículas arrastradas pela corrente dos gases de exaustão em conformidade com o exposto por Gill, Appleton, Baganz e Lye (2008) e Jagani et al.

(2010). É desta forma que passou a ser um componente imprescindível no sistema, justificando assim a avaliação das falhas durante a sua avaliação. Dentro deste nó, o grupo definiu dois parâmetros a serem avaliados, a temperatura e a vazão.

a) Parâmetro: Temperatura

Critério de seleção: A condensação na biorreação, tem como objetivo atender diretrizes regulatórias, por meio da recuperação de gases de exaustão que podem conter microrganismos. Conforme Situmbeko (2015), o sistema segue a mesma estrutura dos trocadores de calor.

Portanto, da mesma forma que nos trocadores de calor, Primo (2012), estabelece que a temperatura é um parâmetro estabelecido para garantir o objetivo de condensação de gases.

Palavras-guia: Kirchner, Wagner, Rehm (1996), Bonham-Carter, Ives, Reeks (2004), estabelecem que a condensação dentro da indústria biotecnológica, é um fenômeno físico, utilizado em operações onde espera-se resfriar os gases de exaustão originados durante a fermentação. Assim, o principal desvio poderia se manifestar quando a temperatura do líquido de resfriamento no condensador não estivesse suficientemente “fria”, portanto a palavra guia é MAIS (maior temperatura).

Causas: O condensador, foi desenhado seguindo as especificações técnicas dos engenheiros que projetaram o sistema de biorreação. Sendo assim, pode-se supor que as causas dos desvios dependem principalmente das propriedades do líquido para diminuição da temperatura e não do dimensionamento do condensador. Assim, as principais causas são, maior temperatura do liquido, e/ou a vazão deste liquido no condensador ser menor ao especificado tal qual mostrado por outros Zhao et al (2013) na avaliação de falhas em sistemas de troca de calor.

Consequências: Como consequência, a recuperação de contaminantes será baixa, portanto, de acordo com McNeil e Harvey (2008), pode ser percebido durante a operação, um aumento significativo na velocidade de saturação dos filtros, além de ser um fator gerador de não conformidades segundo comentadas anteriormente.

NPR: Levando em conta os critérios da severidade, ou não cumprimento de normas, não conformidades, e desvios que possam gerar pendencias regulatórias, a severidade é definida como MUITO ALTA.

Adicionalmente, Mukherjee (1998) menciona que os parâmetros de temperatura do líquido frio não dependem exclusivamente do desenho equipamento, mas, também

de agentes externos (falhas no fornecimento da utilidade), portanto a probabilidade foi estimada como <1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS. Complementarmente, o equipamento foi desenhado com sensores de temperatura na entrada da utilidade, e na saída dos gases de exaustão, os quais para Couper, Penney, Fair e Walace (2005), são controles que permitem identificar falhas na operação de condensação.

Também, a partir da velocidade da saturação dos filtros (etapa posterior), é possível determinar a eficiência do processo de condensação. Por tanto, a detecção de desvios foi definida como MUITO ELEVADA. Na Tabela 18 são apresentados o nível de risco e cálculo de NPR para este parâmetro.

Tabela 18 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Temperatura na operação unitária de Condensação.

Etapa: Biorreação						
Equipamento: Biorreatores de 100 e 600 L						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Mais	Muito Alta	< 1 em 10 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

A análise das medidas de segurança e controle dos biorreatores antes, durante e após o processo, são elevadas em todos os equipamentos relacionados com a operação de transferência de calor (trocadores, condensadores, tanques encamisados).

Além disso, o sistema possui sensores que permitem uma rápida detecção de desvios, e consequentemente, pode ser obtido um NPR menor. Levando em consideração os princípios de biossegurança e regulatórios, durante a qualificação do sistema é recomendado que os especialistas de validação, tracem estratégias, e estabeleçam procedimentos que garantam o monitoramento continuo do funcionamento do condensador antes de entrar na operação de rotina.

b) Parâmetro: Vazão

Critério de seleção: Em complemento com a avaliação do parâmetro anterior, a utilidade fria utilizada para a condensação, tem que ser fornecida dentro da vazão especifica, permitindo assim que a transferência de calor seja constante dentro do

condensador, como mencionado no estudo de eficiência de trocadores de calor realizado por Tassou e Green (1981). Assim o parâmetro deve de ser calculado e mantido constante tanto na entrada como na saída do equipamento.

Palavras-guia: Existem duas palavras guias que foram consideradas neste estudo. Primeiramente, a falta total da utilidade é definida como NÃO, que reflete a ausência total de vazão do liquido em baixa temperatura. O segundo caso foi a palavra MENOS, que é um desvio característico quando o parâmetro é inferior ao necessário para o processo.

Causas: As possíveis causas identificadas pela equipe multidisciplinar, foram definidas como: falhas externas, e do equipamento.

- Externas: A utilidade não é fornecida, ou se encontra fora dos parâmetros necessários para o processo.
- Equipamento: Falhas das válvulas, obstruções nas tubulações.

Consequências: As consequências das falhas são semelhantes ao parâmetro anterior. Segundo Zietlow (1995), a vazão de líquido para resfriamento inferior ao parâmetro calculado para garantir a condensação dos gases de exaustão, vai produzir a perda da capacidade de resfriamento. Esta perda na capacidade de resfriamento vai conduzir nas mesmas consequências relatadas no parâmetro temperatura.

NPR: Sem importar a intensidade da falha, de acordo com a avaliação do parâmetro anterior, a severidade causada pela perda da eficiência da operação é considerada como MUITO ELEVADA. Da mesma forma, pensando no pior cenário, a probabilidade foi avaliada como < DE 1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS. A existência de sensores de temperatura, medidores de vazão e sistema de alarmes, permitiu estabelecer que a detecção de desvios seja MUITO ELEVADA. Na Tabela 19 é apresentado o nível de risco e NPR deste parâmetro.

Tabela 19 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Condensação.

Etapa: Biorreação						
Equipamento: Biorreatores de 100 e 600 L						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Menos	Muito Alta	< 1 em 10 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

Como esperado, os sistemas de detecção de falhas neste sistema, oferecem confiabilidade durante a operação, o mesmo conceito pode ser observado nas pesquisas de Mollah (2005), Pandey, Singn, Sonawane e Rawat (2016), onde os autores estabelecem a relação da capacidade de detecção com o nível de risco em sistemas. Os riscos, mesmo que estimados como não desejáveis, são imediatamente atendidos pelo sistema ajustando automaticamente os parâmetros de operação, além de permitir a rápida intervenção por parte da equipe operacional. Porém, nesta etapa o volume processado é elevado (400 L de cultivo), neste caso, também é aconselhável que os desvios sejam tratados, mesmo que o NPR tenha sido identificados como menor. Assim, a equipe multidisciplinar aconselhou que durante a qualificação do sistema de biorreação, seja verificado o balanço térmico do condensador, e ajustar os parâmetros de operação seguindo as equações para trocadores de calor apresentadas por Incropera (2007), e Theodore (2011) caso o desenho do componente não seja eficiente para recuperação das células.

4.2.7 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Centrifugação

De igual forma que nas etapas anteriores, a continuação será apresentada a avaliação de risco do equipamento que será utilizado em duas etapas de processo, e tem como objetivo segundo Holdrich (2002), o processamento de soluções líquidas para separação de sólidos de líquidos. O desenho das centrífugas utilizadas em ambas as etapas é semelhante entre sim, sendo o tamanho do rotor de recuperação de sólidos a única variável de desenho.

Nesse caso, a equipe multidisciplinar considerou que a capacidade do rotor não é um fator que possa gerar diferentes níveis de risco nas respectivas avaliações nas centrífugas. Desta forma, neste trabalho será apresentada a avaliação que compreende os três equipamentos utilizados para esta operação (1 centrífuga de 8 kg, e 2 centrífugas de 6 kg de capacidade). Caso houver considerações especificas, as diferenças serão sinalizadas na descrição de causas, consequências, e índices de severidade, probabilidade e detecção dos desvios. A seguir encontra-se a avaliação do nível de risco e NPR para esta operação unitária.

a) Parâmetro: Tempo (residência de sólidos no rotor)

Critério de seleção: Conforme estipulado por Letki, Moll e Shapiro (1997), Beveridge (2000) e Chen, Gerber, Hart, Capone (2013), a separação das fases líquida e solida dentro do rotor da centrífuga, depende da relação da vazão e aceleração do rotor. De acordo com McCabe, Smith e Harriot (2005), quanto maior tempo o liquido permanecer dentro do rotor, o volume líquido será reduzido, e a concentração de sólidos acumulada nas paredes do rotor será maior, no estudo de caso aqui apresentado, esta condição aumentaria o rendimento do processo.

Palavras-guia: Os potenciais desvios sugerem que a operação esteja sendo realizada fora dos limites do processo. Portanto, as palavras guias MENOS e MAIS, exemplificam essas falhas.

Causas: As causas de ambos os desvios são resultado de problemas nos parâmetros operacionais do equipamento.

- Operacionais: Vazão fora dos parâmetros de processo, pouco volume de líquido dentro do rotor.

Consequências: Segundo especialistas, o tempo inferior de permanência da mistura solido líquido dentro do rotor (o líquido passa em alto fluxo), pode resultar na baixa capacidade de separar estas fases (LANDER; DANIELS; MEACLE, 2005 e CHUNGCHAROEN et al. 2017), esta falha está relacionada com a perda de produto na corrente de saída.

Em contrapartida, maior tempo de permanência pode reduzir a humidade e compactar excessivamente a biomassa, afetando desta forma a eficiência da ruptura na etapa posterior (AXELSSON, 1999).

NPR: No primeiro desvio, a severidade foi considerada como ALTA, por motivos de potenciais perdas de produto. O grupo multidisciplinar definiu a probabilidade como < 1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS, para qualquer desvio fora dos limites estabelecidos (superior e inferior).

Para o segundo desvio, a severidade foi considerada como MENOR, porque os efeitos são facilmente reversíveis na próxima etapa. Ainda que existam dispositivos que consigam medir a vazão do liquido na entrada da centrífuga, se faz necessário estabelecer uma correlação entre vazão e tempo para identificar desvios do parâmetro, portanto, a detecção foi BAIXA. Na Tabela 20 é apresentado o nível de risco dos desvios do parâmetro e o número de priorização de risco.

Tabela 20 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Tempo na operação unitária de Centrifugação.

Etapa: Centrifugação do Cultivo, Centrifugação e Lavagem						
Equipamento: Centrífugas de 6 e 8 kg						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Menos	Alta	< 1 em 4 processos	Não desejável		Baixa	Médio	
Mais	Menor	< 1 em 4 processos	Aceitável		Baixa	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

b) Parâmetro: Vazão

Critério de seleção: Como mencionado anteriormente, e de acordo com Hamamoto Ishimaru e Tokashiki (1990), a eficiência da recuperação de sólidos na centrífuga, depende exclusivamente da rotação do rotor, e da vazão de liquido na entrada (tempo de permanência no rotor). Portanto, em consenso com a equipe de especialistas, este último foi considerado como parâmetro a ser caracterizado e os seus riscos avaliados.

Palavras-guia: Os desvios característicos do parâmetro são: NÃO, MENOS e MAIS.

Causas: As causas dos desvios podem ser explicadas segundo Maybury, Hoare, e Dunnill (2000), a partir de problemas nos parâmetros operacionais do equipamento, e por falhas no material.

- Operacionais: Vazão fora dos parâmetros de processo, falta parcial ou total de líquido dentro do rotor.
- Materiais: Rompimento e/ou vazamentos na tubulação flexível.

Consequências: No primeiro desvio, a falta total de produto do equipamento, demanda a imediata interrupção do processo até analisar a origem dos desvios, e a necessidade de aplicar medidas de tratamento. Desvios onde a operação é realizada fora dos limites de processo, podem resultar na baixa eficiência de recuperação de sólidos como sugerem Wong, O'Neill e Middelburg (1996), e consequentemente na perda de produto.

NPR: A equipe determinou que a ausência de vazão na entrada da centrífuga, é um desvio com severidade MUITO ALTA, no entanto, a probabilidade de acontecer é INCOMUM. A vazão inferior ao esperado tem como severidade o índice MENOR, e no caso estar acima do esperado é ALTA. Para ambos os casos, a probabilidade de ocorrer foi definida como <1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. O medidor de vazão instalado na entrada do equipamento, e o ajuste no painel de controle na etapa

anterior, permitem detectar qualquer desvio, inclusive antes da entrada do líquido no equipamento, portanto, foi definida como MUITO ELEVADA. Na Tabela 21 é apresentado o nível de risco dos desvios do parâmetro e o número de priorização de risco.

Tabela 21 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Vazão na operação unitária de Centrifugação

Etapa: Centrifugação do Cultivo, Centrifugação e Lavagem						
Equipamento: Centrífugas de 6 e 8 kg						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Não	Muito alta	Incomum	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	
Menos	Menor	< 1 em 4 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	
Mais	Alta	< 1 em 4 processos	Aceitável		Muito Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

c) Parâmetro: Nível (acumulo de sólidos no rotor)

Critério de seleção: O produto de interesse na biomassa recombinante (proteína terapêutica de alto valor agregado), encontra-se na forma de corpos de inclusão dentro do citoplasma bacteriano, assim, de acordo com SINGH et al (2015) o acumulo no rotor da biomassa e *debris* celular após rompimento, é um indicador que permite definir a eficiência e rendimento do processo.

Palavras-guia: A equipe definiu as palavras-guia desta etapa como desvios da função quando não cumpre os parâmetros de processo, portanto, o desvio MENOS é o mais importante para analisar neste parâmetro. Dado que, é desejável recuperar ó máximo possível de sólidos, o desvio MAIS, não foi considerado nesta avaliação.

Causas: Existem duas causas principais que podem levar o desvio, a uma falha do processo e a operacional.

- Processo: Baixa concentração celular no líquido a separar (fatores externos à operação).
- Operacionais: Outra causa definida pelo grupo e no trabalho de Thatcher (1989) na avaliação de operação de centrífugas de fluxo continuo, é a faixa de vazão na entrada ser muito elevada, ou estar fora do parâmetro de operação.

Consequências: Da mesma forma quer nos casos anteriores, o resultado deste desvio, foi definido como baixa recuperação de sólidos, e perda de produto não separado na corrente de saída na centrífuga (descarte).

NPR: O produto é de alto valor agregado, portanto, as pequenas perdas e baixa recuperação de sólidos, são considerados como desvios de severidade MODERADA. Somado a isso, a quantidade de biomassa no cultivo, não depende desta etapa, portanto a probabilidade foi considerada como < DE 1 VEZ A CADA 4 PROCESSOS. Para determinar a capacidade do sistema de detectar o desvio, foi considerado que o nível de sólidos retidos no rotor será verificado após concluir a operação, sendo assim, a detecção é BAIXA. Na Tabela 22 é apresentado o nível de riscos e o NPR.

Tabela 22 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Nível na operação unitária de Centrifugação.

Etapa: Centrifugação do Cultivo, Centrifugação e Lavagem					
Equipamento: Centrífugas de 6 e 8 kg					
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade***	**Nível de Risco**	**Detecção**	**NPR**
Menos	Moderada	< 1 em 4 processos	Não desejável	Baixa	Baixo

Fonte: O autor, 2016.

Analisando os três parâmetros desta operação unitária, é possível perceber a correlação que existe entre o tempo de residência, o acúmulo dos sólidos no rotor, e a vazão da solução, esta relação foi amplamente estudada por Ortega-Rivas e Perez-Vegas (2011), Pouliot, Conway e Leclerc, (2014), Majekodunmi (2015), Chungcharoen, et al. (2017), permitindo assim, entender a influência de uma falha no desempenho dos outros parâmetros. Assim, pode-se esperar que a implementação de medidas preventivas ou de mitigação, sejam efetivas para os desvios dos três parâmetros, sem haver necessidade de aplicar medidas para cada um deles.

4.2.8 Aplicação da metodologia integrada de análise de risco na operação unitária de Compressão

Finalmente, a última operação unitária considerada como crítica pela equipe multidisciplinar foi a compressão realizada dentro do homogeneizador de alta pressão no processo de ruptura. A seleção desta operação unitária, baseou-se na importância

que desempenha esta operação para recuperação de proteínas sinalizada por Chisti e Moo-Young (1986), Harrison (1991 e 2011) e Geciova, Bury, Jelen (2002), e pelas condições de processo que em muitos casos são consideradas de alto risco na indústria em função da elevada pressão utilizada durante o processo de ruptura celular (AHMAD-RAUS; MEL; MOHD-ABDULLAH; YUSOFF, 2010). A seguir, são mencionados os critérios que foram considerados para avaliação de risco desta operação.

Parâmetro: Pressão

Critério de seleção: Uma das características do processo estudado, é que o produto de interesse se encontra na forma de corpos de inclusão (agregados proteicos devido a super-expressão da proteína heteróloga) - dentro da célula bacteriana segundo sinalizado por Senorale-Pose e Marin (2000), Miot, Sasson e Betton (2006), Peternel e Komel (2011). Assim, o rompimento celular nesta etapa permite a exposição dos corpos de inclusão, que posteriormente serão recuperados segundo procedimentos estabelecidos pelo processo produtivo. Finalmente, eficiência do rompimento celular, para recuperação dos corpos de inclusão depende diretamente da pressão exercida sobre as células, preocupando-se também em não afetar a estrutura física das proteínas (BAILEY; BLUM; MEAGHER, 1996).

Palavras-guia: De acordo com Van Hee et al, (2004), a pressão é o parâmetro crítico a ser estudado, no qual os desvios da função podem criar efeitos adversos para o produto, e para a integridade do processo e do equipamento. Portanto, foram considerados os três níveis característicos de falhas. NÃO, para falha total da função, MENOS e MAIS, que refletem desvios onde os limites de aceitação superior e inferior são ultrapassados.

Causas: O homogeneizador de alta pressão, é um equipamento que depende da correta parametrização dos limites de operação. Entretanto, sendo conformado por peças e componentes mecânicos convencionais, está sujeita às mesmas falhas de qualquer outro equipamento utilizado no processo. Assim, as causas foram divididas da seguinte forma.

- Operacionais: Parâmetro de operação errado, válvulas de entrada ou saída fechadas ou bloqueadas
- Mecânicos: Falhas no motor

- Materiais: Rompimento da válvula de homogeneização, falha na vedação da câmara de homogeneização

Consequências: Baixa eficiência de rompimento e perda de, são as consequências mais prováveis se a pressão de operação é inferior ou nula segundo Peternel e Komel (2010). A pressão maior, pode ocasionar o desgaste prematuro dos componentes do equipamento, explosão, e danificação ao equipamento, usuários e área.

NPR: A incapacidade de rompimento da célula, é considerado como um risco de severidade MUITO ALTA, devido à necessidade de reprocessamento ou perda do produto, a probabilidade deste desvio é INCOMUM. Quando a pressão não atinge o valor necessário para execução do processo, é considerado como um desvio MODERADO, e igualmente será necessário o reprocessamento do produto. A probabilidade foi estimada em < DE 1 VEZ A CADA 10 PROCESSOS. Finalmente, riscos com impactos severos para o pessoal e infraestrutura são considerados CATASTRÓFICOS, mas a probabilidade foi definida como INCOMUM. O sistema foi construído com vários manômetros conectados ao sistema supervisório, que monitoram o sistema, ajustando automaticamente a pressão quando necessário, portanto a detecção é MUITO ELEVADA. Na Tabela 23 é apresentado o nível de risco dos desvios do parâmetro e o número de priorização de risco.

Tabela 23 - Nível de Risco e cálculo do NPR do parâmetro Pressão na operação unitária de Compressão.

Etapa: Rompimento Celular						
Equipamento: Homogeneizador de Alta Pressão						
Desvio	**Severidade**	**Probabilidade**	**Nível de Risco**		**Detecção**	**NPR**	
Não	Muito Alta	Incomum	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	
Menos	Moderada	< 1 em 10 processos	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	
Mais	Catastrófica	Incomum	Não desejável		Muito Elevada	Baixo	

Fonte: O autor, 2016.

Como observado na Tabela anterior, o desvio de **maior pressão**, é considerado o desvio de maior severidade de toda a etapa da montante – ou seja, da produção de biomassa recombinante. Por esse motivo, durante o a especificação e aquisição do equipamento, foram traçadas estratégias e desenhadas medidas

redundantes de controle e segurança. Conforme Snoswell (1991) e Wong (1997), espera-se que sejam evitadas as fontes que possam conduzir aos desvios ainda nas etapas anteriores à operação unitária analisada, ou quando menos, evitar o desenvolvimento do máximo potencial das consequências.

Adicionalmente, no caso específico do desvio “Mais”, foi observado que o nível de risco é o resultado da combinação de um evento de severidade máxima, mas com uma probabilidade muito baixa. Estes riscos, melhores conhecidos como “HILF” (high-impact, low-frequency events), ou eventos de alto-impacto, baixa-frequência, têm sido profundamente estudados recentemente, onde especialistas como Veeramany et al (2015), estabelecem diferentes critérios que permitam um melhor entendimento dos efeitos da severidade e eventos muito pouco prováveis de acontecer, durante a avaliação de riscos. O interesse dos especialistas é explicado através do entendimento da premissa que estabelece que os efeitos catastróficos obrigatoriamente precisam de ser tratados prioritariamente até o nível de risco ser reduzido (MASSINGHAM, 2010).

Não obstante, a baixa probabilidade descarta praticamente que o evento vai acontecer. Assim sendo, diversos especialistas em gestão de risco como Merz, Elmer e Thieken (2007), Dietz (2011), Hiroki (2012), Lee, Preston e Green (2012), Garfin et al. (2015), Abadie, Galarraga e Murieta (2017), apresentam uma nova abordagem e utilizam modelos inovadores que permitem estabelecer a priorização dos riscos HILF, utilizando modelos estocásticos (ou probabilísticos) em situações similares. Particularmente para este trabalho, a equipe multidisciplinar considerou desnecessário elaborar um novo modelo de avaliação de riscos, esta decisão baseou-se na asserção que modelos estocásticos são muito difíceis de serem construídos, e se tratando de modelos probabilísticos, são suscetíveis a erros de modelo, além de não existir um argumento que justifique a construção de um novo modelo para tratar somente um desvio.

Mesmo assim, a equipe considerou que durante a qualificação do sistema, este equipamento seja cuidadosamente analisado, visando reduzir consideravelmente a severidade dos impactos.

4.3 Avaliação da Severidade, Probabilidade, Detecção e NPR nas etapas do processo produtivo de biomassa recombinante.

Após estabelecer o nível de risco das operações unitárias envolvidas na produção de biomassa recombinante e identificar aquelas com maior índice de criticidade, foi realizada uma avaliação da influência dessas operações no processo produtivo, permitindo assim, identificar os sistemas e equipamentos que precisem especial atenção durante a qualificação e validação.

4.3.1 Propagação Celular

Para contextualizar a análise em cada etapa será apresentado um resumo com os nós, parâmetros de processo, número de desvios e palavras guias. Na Tabela 24 é apresentado um resumo dos nós (operações unitárias), os diferentes parâmetros avaliados, e os seus respectivos desvios.

Tabela 24 - Nós da etapa de propagação celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo.

Etapa	Nós	Parâmetro	No de desvios	Palavra guia
Propagação Celular	Agitação	Agitação	3	Não/ Menos/Mais
	TC	Temperatura	2	Não/ Menos/Mais
	Filtração	Vazão	3	Não/ Menos/Mais
	BP	Volume liquido	2	Menos / Mais
		Rotação	2	Menos / Mais
		Vazão	3	Não/ Menos/Mais

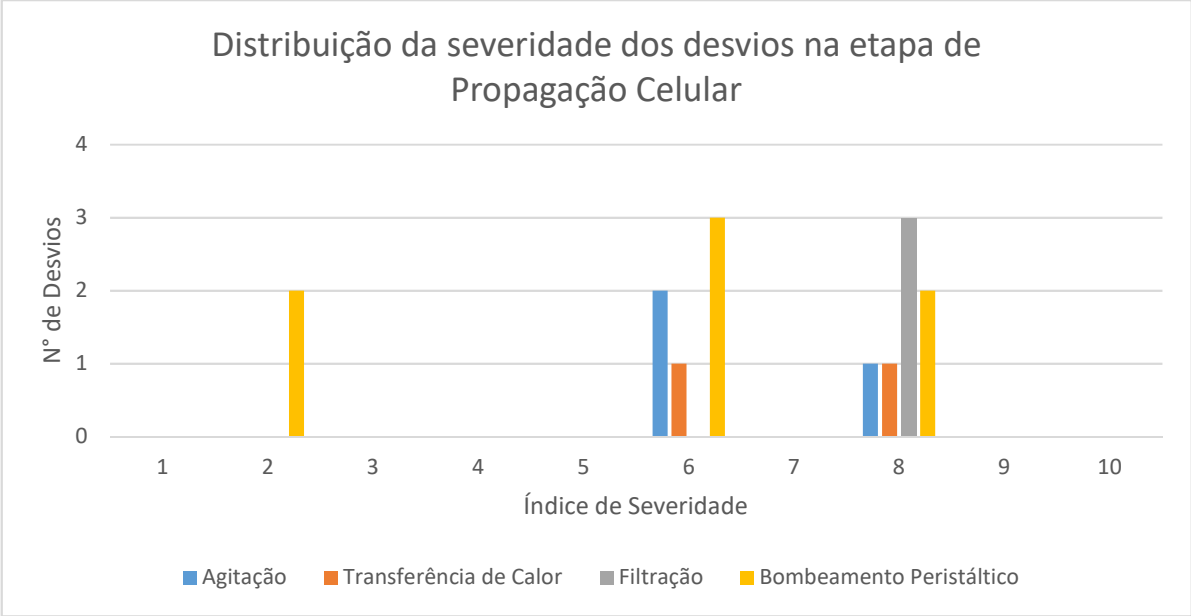
Fonte: O autor, 2017.

I - Severidade

A partir da análise anterior dos Nós (total de 8, representando as operações unitárias envolvidas no processo de produção de biomassa recombinante), foi realizada a quantificação dos riscos utilizando como base o relatório de análise de risco apresentado no ANEXO 1.

Na propagação celular foram identificadas 04 operações unitárias, 06 palavras-guia (parâmetros), e 15 desvios. Na Figura 24 é apresentada a distribuição do nível de severidade para esta etapa.

Figura 24 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de propagação celular.



Fonte: O autor, 2016.

Desta forma, de acordo com os critérios mencionados na metodologia deste trabalho, é possível perceber que a severidade dos 15 desvios da etapa de propagação celular, teve o seguinte comportamento:

- Muito Alta 47%
- Moderada 40%
- Muito Menor 13%

Segundo Wesse e Prescott (2009), em processos de propagação celular em pequena escala (laboratório), não são utilizados equipamentos de alta complexidade ou condições extremas de operação (pressão, volume, vazão),portanto, foi considerado que os desvios afetam exclusivamente o produto. Uma vez que o cultivo bacteriano é um elemento de alto valor agregado, principalmente na indústria biofarmacêutica que gera vacinas ou proteínas terapêuticas (PALOMARES; KURI-BREÑA; RAMIREZ, 2015), somente foram considerados riscos que representem contaminação ao produto, ou baixos rendimentos de processo.

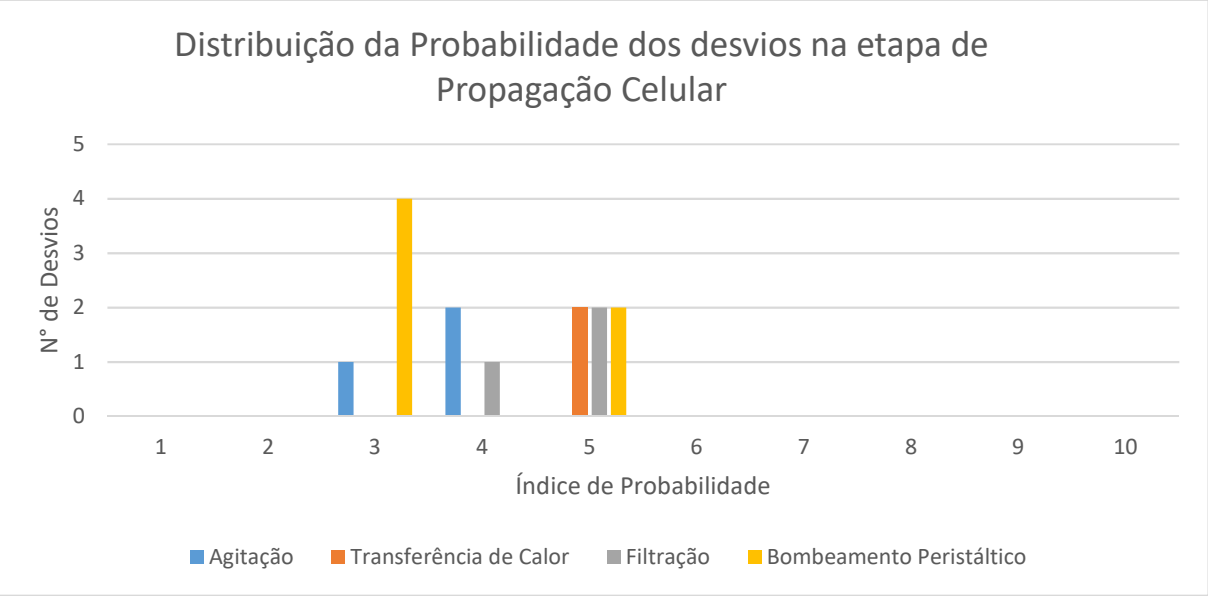
II – Probabilidade

Analisando a probabilidade dos 15 desvios na etapa da propagação celular, a probabilidade de eventos predominante foi a classificada como:

- < 1 desvio em 4 processos 40%
- Incomum 33%
- < 1 evento a cada 10 processos 20%

O processo estudado ainda não está em operação, portanto as probabilidades de eventos foram definidas considerando o “pior caso” possível segundo recomendado nas avaliações de risco elaboradas por Sawant et al (2010), e Pawar (2016). Entretanto, a elevada intervenção do pessoal técnico para execução das operações no processo (que é uma característica da indústria farmacêutica), faz mandatória a aplicação de padrões internacionais de qualidade, que estabelecem o registro e seguimento de procedimentos operacionais padrão (CHALONER-LARSSON; ANDERSON; EGAN, 1997). Portanto, quando são aplicados corretamente, e em cumprimento com as diretrizes das BPF, não há possibilidade de geração de desvios, reduzindo de forma importante a probabilidade destes. O perfil da probabilidade de eventos desta etapa é mostrado na Figura 25.

Figura 25 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de propagação celular.



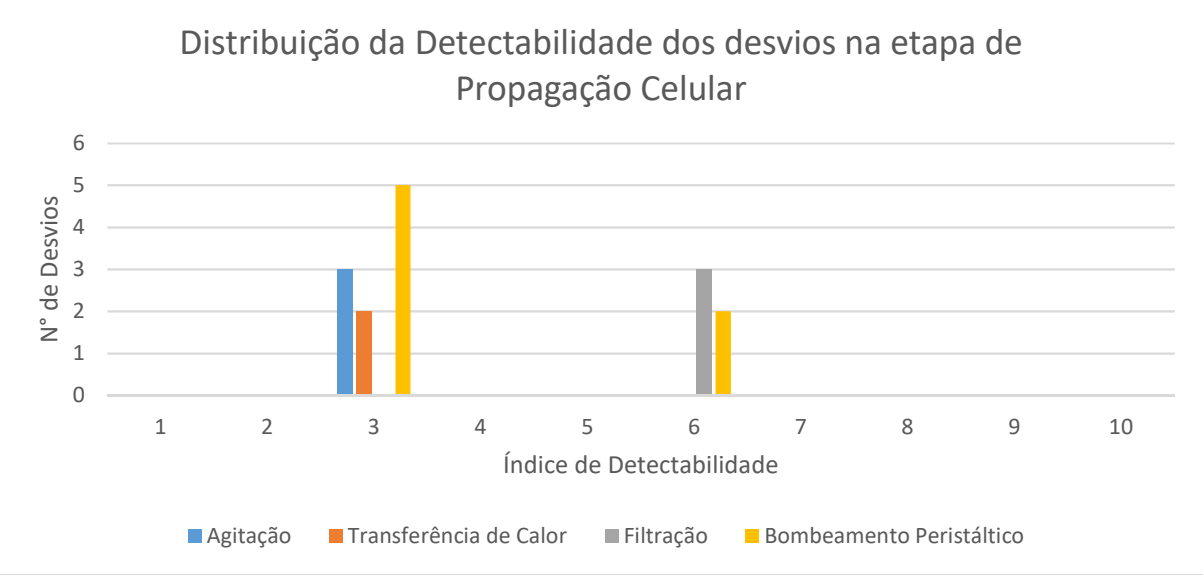
Fonte: O autor, 2016.

III – Detecção

Na Figura 26 é apresentada a classificação do nível de detecção de desvios, onde 67% podem ser identificados com elevada detecção, e 33% foram considerados de baixa detecção. Estes valores foram definidos seguindo os critérios de detectabilidade mencionados anteriormente, nos quais a capacidade de detecção, depende exclusivamente dos controles, dispositivos(melhor capacidade de detecção de falhas) e segundo Ozilgen (2012), procedimentos realizados pelo pessoal técnico

durante a operação (a detecção depende de procedimentos realizados pelos operários).

Figura 26 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de propagação celular.



Fonte: O autor, 2016.

Segundo Mandal et al. (2015), erros humanos que dão origem a falhas são difíceis de quantificar, o que se reflete como uma característica desta etapa da produção de biomassa recombinante. Uma vez que as ferramentas de apoio para definição do NPR, são baseadas na quantificação de eventos através de registros e dados históricos (YANG et al., 2015), a falta de informação do comportamento dos operadores dentro da área de processo estudada neste trabalho, é um ponto crítico a ser considerado. Nesta etapa operações como a colocação dos filtros nos equipamentos é uma operação realizada manualmente, e a verificação da integridade durante o processo é executada pelo responsável técnico em períodos entre processos, e não de forma continua segundo indicado por Garafola, (2011).

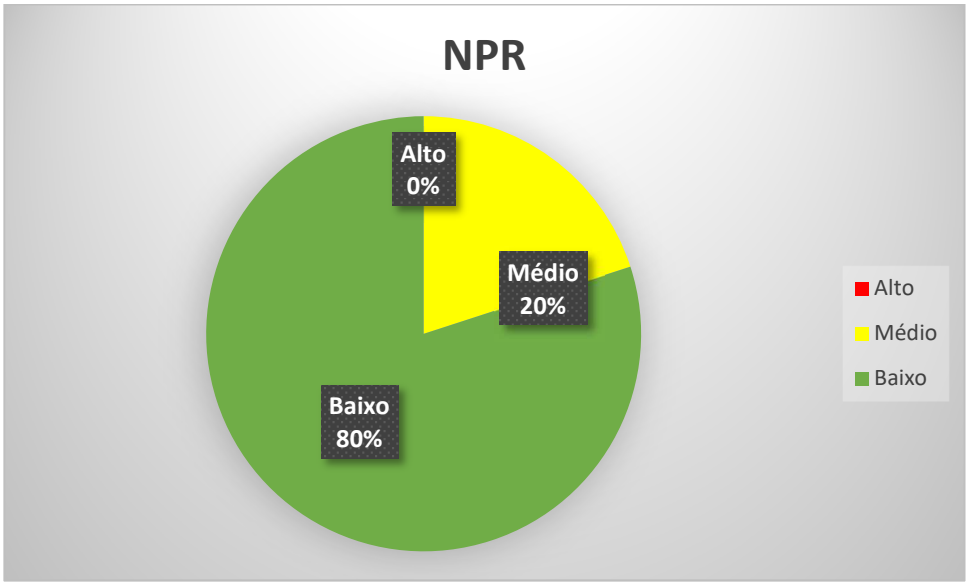
Desta forma, a operação unitária de filtração no parâmetro “vazão”, teve os valores de NPR mais elevados, sendo todos eles classificados como médios. Esta classificação foi determinada da seguinte forma:

Desvio 1	(S*P) 36 * (D) 6 = 144
Desvio 2	(S*P) 40 * (D) 6 = 192
Desvio 3	(S*P) 40 * (D) 6 = 192

IV – NPR

Sendo assim, nesta operação unitária, os desvios anteriores foram considerados para serem tratados, visando a redução do NPR até níveis mais aceitáveis. Uma vez aplicadas as medidas nos NPR considerados como médio, deverão ser aplicadas nos riscos restantes as medidas e recomendações listadas no relatório do ANEXO 1, isto é, o NPR é uma medida de priorização de tratamento e não de aceitação. Assim, todos os riscos aqui listados, estarão sujeitos a tratamento se for viável economicamente ou simplesmente serão aceitos. Na Figura 27 é apresentada a distribuição do NPR para esta etapa.

Figura 27 - Distribuição do NPR na etapa de propagação celular.



Fonte: O autor, 2016.

Como esperado, não houveram riscos classificados como altos, com apenas 20% classificados como médio e 80% classificados como baixos. Dado que a propagação é uma etapa com alto nível de intervenção humana, espera-se que em outras etapas onde a manipulação direta do pessoal técnico seja necessária, o perfil de risco e NPR podem seguir a mesma tendência.

4.3.2 Biorreação

Na Tabela 25 é apresentado um resumo dos nós (operações unitárias), os diferentes parâmetros avaliados, e os seus respectivos desvios para a etapa de Biorreação.

Tabela 25 - Nós da etapa de biorreação e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo.

Etapa	Nós	Parâmetro	No de desvios	Palavra guia
Biorreação	Absorção	QO_2	2	Menos/Mais
	Agitação	Velocidade	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de Calor (1)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Filtração (1)	Vazão	3	Não/Menos/Mais
	Condensação	Temperatura	1	Mais
		Vazão	1	Menos
	Bombeamento Peristáltico	Volume	2	Não/Menos
		Rotação	2	Menos/Mais
		Vazão	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de Calor (2)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Agitação (2)	Velocidade	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de Calor (3)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Transferência de Calor (4)	Temperatura	1	Mais
	Filtração (2)	Vazão	3	Não/Menos/Mais

Fonte: O autor, 2017.

I - Severidade

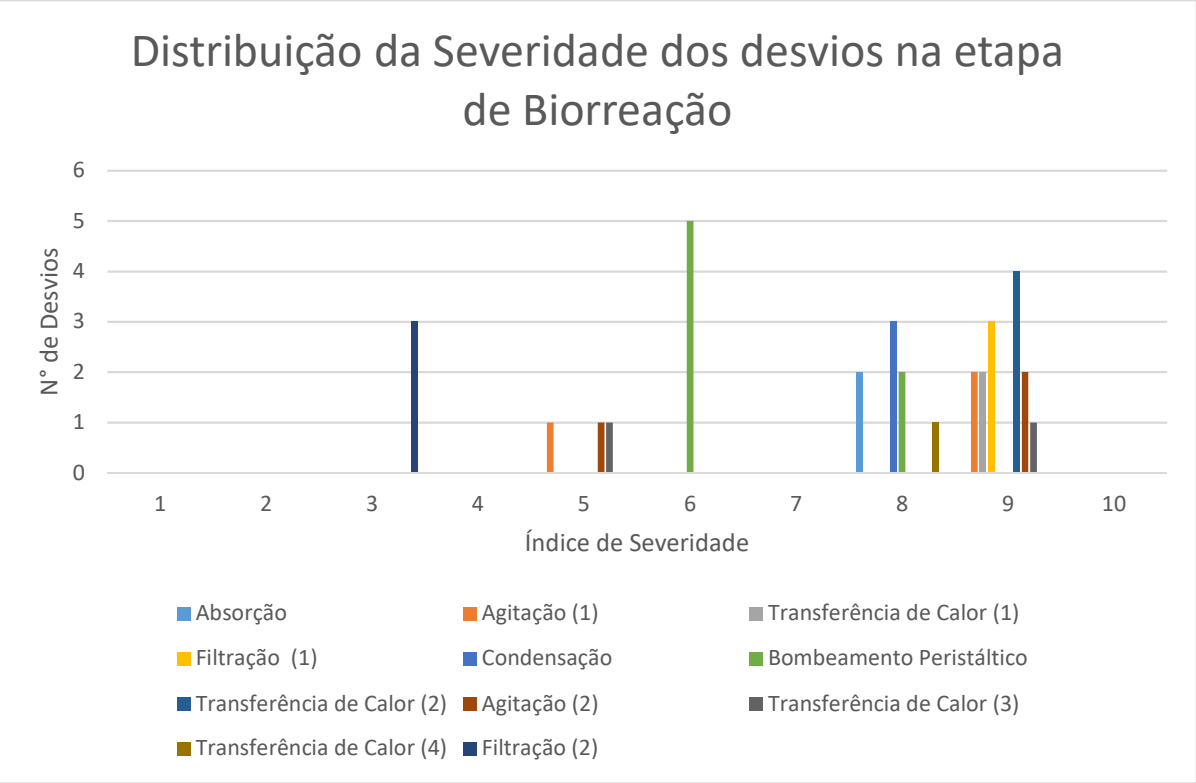
Na Figura 28 é apresentada a análise da severidade na etapa de biorreação, onde 11 operações unitárias foram identificadas, contabilizando 33 desvios no total. Se tratando de um sistema composto por diversos componentes e equipamentos uma operação unitária pode ser utilizada repetidamente durante um processo (AMAYA; BARRAGÁN; TAPIA, 2013).

Para facilitar o entendimento, na Tabela foi utilizada a sequência 1, 2, 3, etc., que representa a operação unitária sendo avaliada em equipamentos diferentes que compõem o sistema.

O índice de severidade nos 33 desvios encontrados na etapa de biorreação foram classificados da seguinte forma:

- Crítico 42%
- Muito Alto 18%
- Moderado 15%
- Baixo 9%
- Menor 9%.

Figura 28 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de biorreação.



Fonte: O autor, 2016.

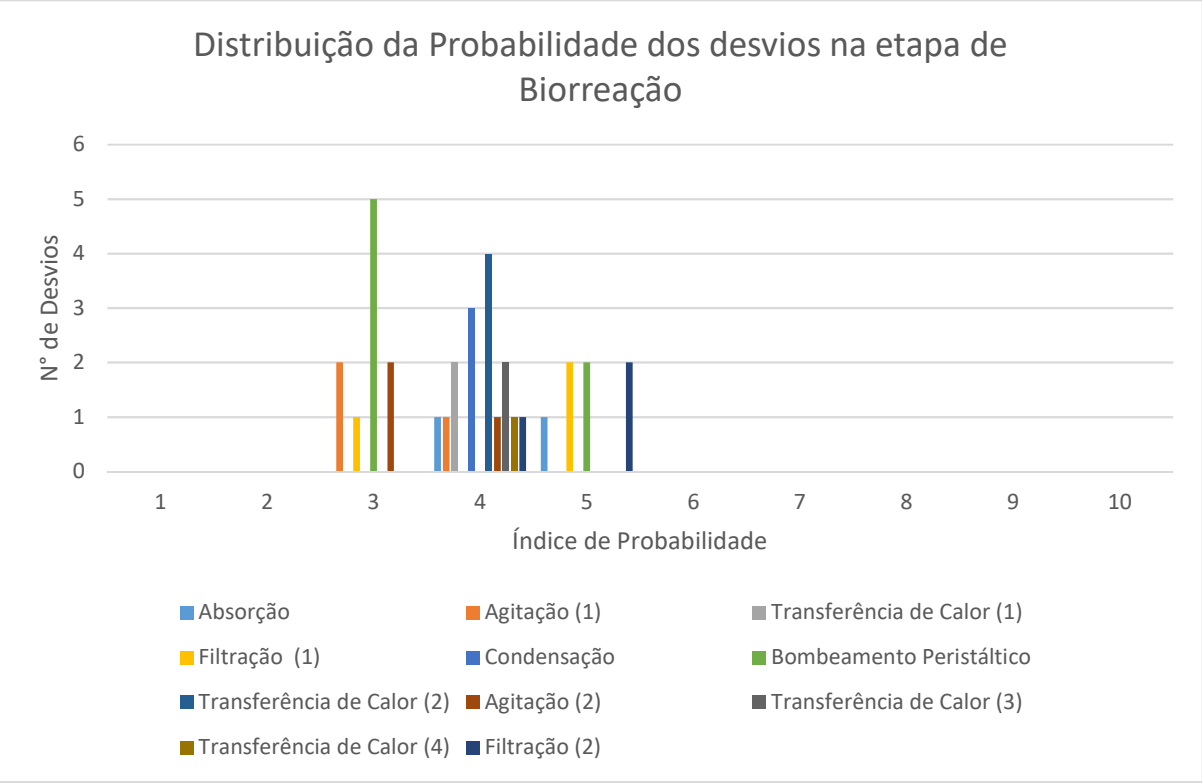
A elevada quantidade de desvios de alto impacto, pode ser explicada a partir do alto volume de produto que será processado dentro do sistema de biorreação. Além da alta complexidade e custo dos equipamentos utilizados e a dependência entre eles para realização do processo (VERITAS, 2009), o estabelecimento da severidade dos desvios na etapa de biorreação considerou perda de produto e o possível dano dos equipamentos envolvidos no processo.

II - Probabilidade

Como pode ser observado na Figura 29, a probabilidade dos desvios seguiu o seguinte comportamento:

- < 1 vez a cada 4 processos 22%
- < 1 vez a cada 10 processos 48%
- Incomum 30%

Figura 29 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de biorreação.



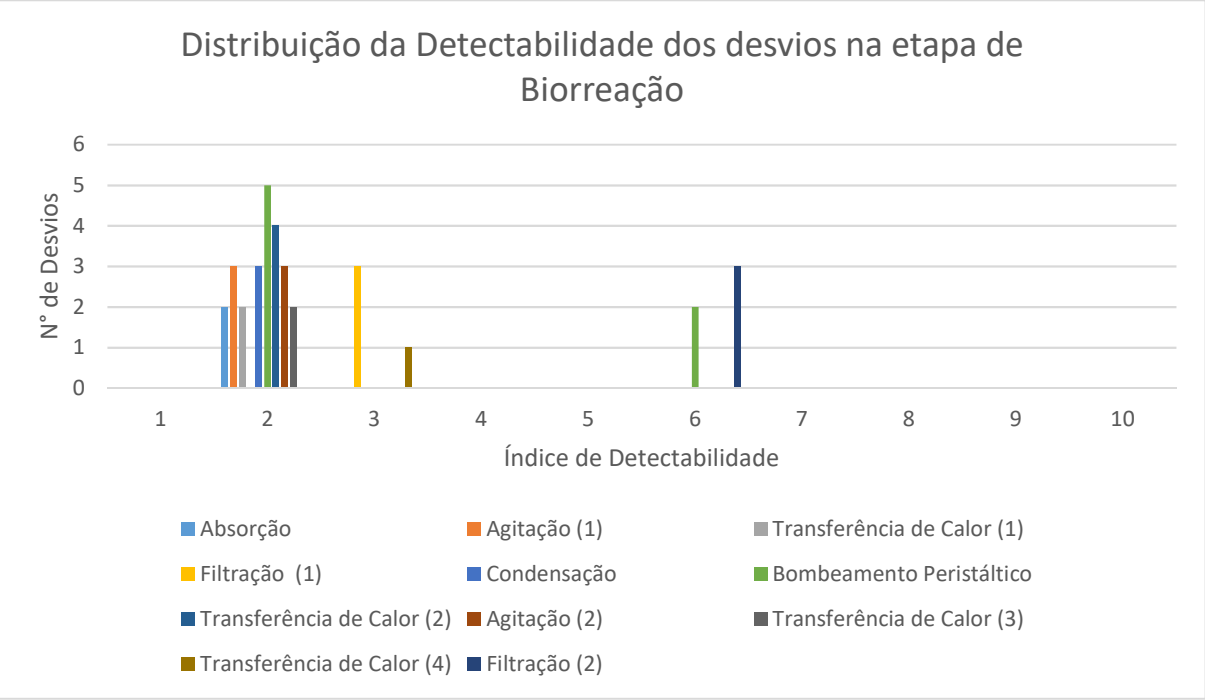
Fonte: O autor, 2016.

Pode ser observado na anterior figura, que a baixa probabilidade de eventos negativos, pode ser resultado do alto nível de automação do sistema, que de acordo com Wildboldt et al. (2009), a probabilidade é inversamente proporcional à capacidade do sistema de identificar variações nos parâmetros de processo. Outro fator que contribui para minimizar a probabilidade de falhas, é a qualificação recorrente do equipamento, que segundo Karmacharya (2012) por exigência do órgão regulador e implementação de BPF, deve ser programada ao longo da vida útil do equipamento, e durante os lotes produtivos.

III - Detecção

Na Figura 30, é apresentado o perfil de detecção de desvios na etapa de biorreação.

Figura 30 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de biorreação.



Fonte: O autor, 2016.

Este perfil de alta capacidade de detecção pode ser explicado considerando a instrumentação instalada no sistema, tal como sensores de temperatura, célula de carga, medidor de nível, medidor de vazão, sonda de pH e condutividade *on-line*, que em alguns dos casos, por segurança, formam parte de um sistema redundante de detecção. Assim, a distribuição de detecção foi identificada como:

- Baixa 15%
- Elevada 12%
- Muito Elevado 73%

Além da alta automação e controles, o sistema antes de entrar em operação, será qualificado seguindo procedimentos de QI, QO, QD previamente mencionados, e de acordo com Bhattcharya (2015), além de tratar-se de um requerimento prévio para atender a BPF (RDC 17/2010) para o sistema de Gerenciamento de Risco a Qualidade. Como complemento aos sistemas de detecção, os protocolos de operação (POPs) e registros, acrescentam o nível de detecção de falhas, uma vez que, a análise de relatórios de operação pode oferecer elementos de detecção através da análise estatística do processo.

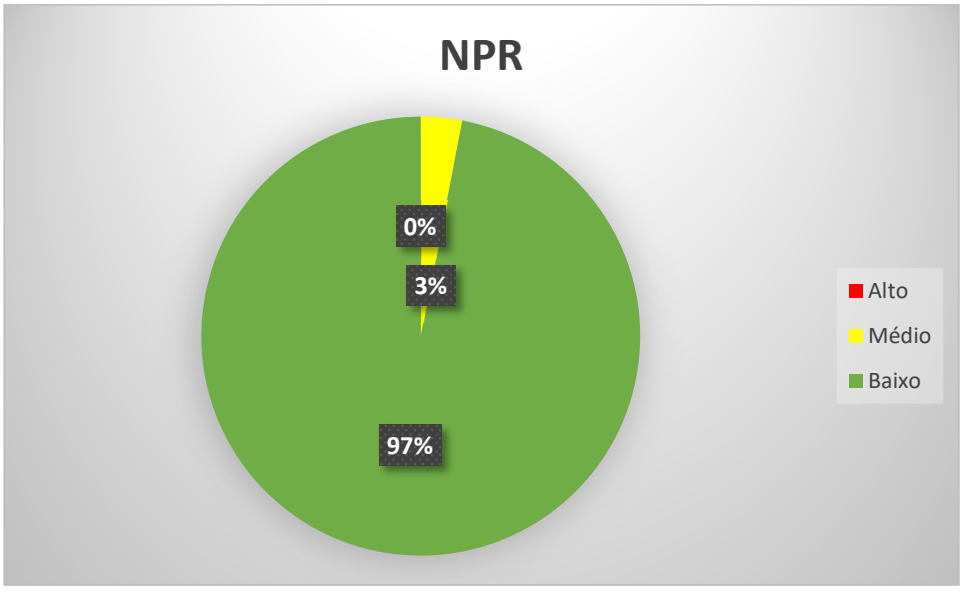
IV - NPR

Com os valores do nível de risco e da detectabilidade, foi calculado o número de priorização de risco para cada desvio da etapa de biorreação. Desta forma, no quarto nó, o parâmetro **"vazão**", apresentou o único NPR dentro da classificação de médio. Este comportamento é influenciado pelo índice da probabilidade, e contrário ao esperado, não depende da capacidade de detecção:

- Desvio 1 (S*P) 45 * (D) 3 = **135**

Ainda que, o valor do número de priorização de riscos é menos significativo que na etapa anterior (propagação celular), é recomendável aplicar medidas que permitam reduzir esse valor através de procedimentos ou dispositivos que não sejam geradores de custos elevados, tal qual recomendado por Kohler et al (2017). Na Figura 31 é apresentada a distribuição de NPR para esta etapa.

Figura 31 - Distribuição do NPR na etapa de biorreação.



Fonte: O autor, 2016.

Neste caso, se houver um NPR alto, toda a etapa de biorreação poderia ficar inviabilizada, e comprometer a integridade do produto. O elevado percentual deNPR classificado como menor (97%), reflete a excelência do desenho do sistema de biorreação, que permite o controle constante dos parâmetros de processo. No entanto, como mencionamos em outros momentos estas análises são proativas e precisam ser analisadas e validadas com dados "reais" gerados durante a rotina de produção.

4.3.3 Centrifugação do Cultivo

Na Tabela 26 é apresentado o resumo dos nós e os seus respectivos desvios na etapa de centrifugação celular e inativação de sobrenadante.

Tabela 26 - Nós da etapa de centrifugação celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo.

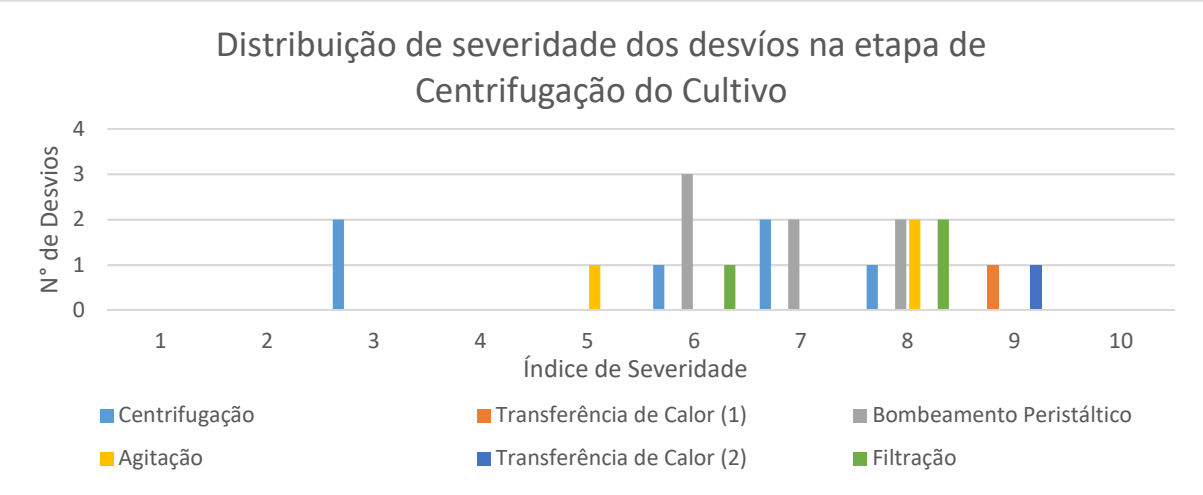
Etapa	Nós	Parâmetro	No de desvios	Palavra guia
Centrifugação do Cultivo	Centrifugação	Tempo	2	Menos/Mais
		Vazão	3	Não/Menos/Mais
		Nível	1	Menos
	Transferência de Calor (1)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Bombeamento Peristáltico	Volume	2	Não/Menos
		Rotação	2	Menos/Mais
		Vazão	3	Não/Menos/Mais
	Agitação	Velocidade	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de calor (2)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Filtração	Vazão	3	Não/Menos/Mais

Fonte: O autor, 2017.

I - Severidade

Para a etapa de centrifugação do cultivo bacteriano, foram identificados 06 nós e 21 desvios. O perfil dos índices de severidade dos desvios identificados dentro da etapa de centrifugação do cultivo bacteriano está representado na Figura 32.

Figura 32 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de centrifugação do cultivo.



Fonte: O autor, 2016.

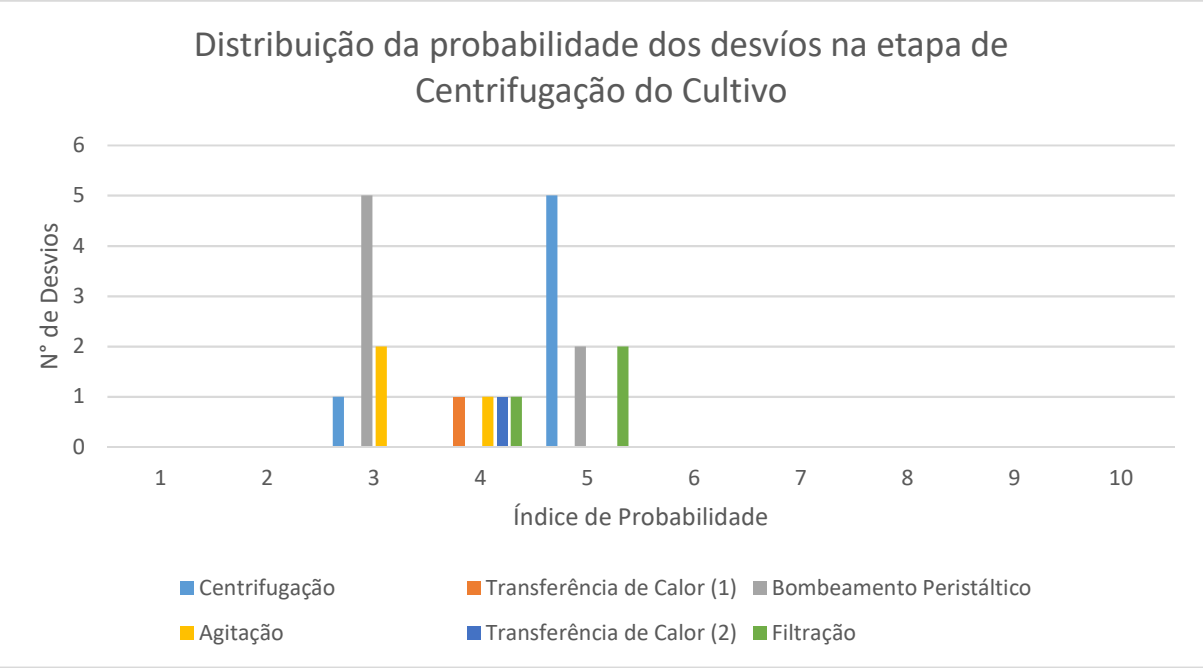
É importante destacar que, este caso o nível crítico de severidade não tem relação direta com a integridade nem funcionamento do sistema, e sim com potenciais descumprimentos da regulamentação estabelecida segundo sinalizado por Ambekar, Edlabadkar e Shrouty (2013) na avaliação dos efeitos de desvios na implementação de um sistema de avaliação de riscos utilizando o modo de falhas e efeitos. Este é o caso do tanque de inativação (nó 4 e nó 5), onde desvios com potencial descumprimento das diretrizes do órgão regulador, são considerados como críticos. Assim a distribuição de índice de severidades foi estabelecida como:

- Crítico 10%
- Muito Alto 33%
- Alto 19%
- Moderado 24%
- Baixo 05%
- Menor 10%

II - Severidade

É possível perceber na Figura 33 a seguinte distribuição da probabilidade de ocorrência dos desvios.

Figura 33 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de centrifugação do cultivo.



Fonte: O autor, 2016.

Esta probabilidade foi estipulada considerando o nível de automação do sistema e o cumprimento de procedimentos de operação, e de acordo com Cembranel e Lopes (2012), esse nível de automação, certamente reduz a ocorrência dos eventos, erros e falhas que podem se manifestar ao longo da operação. A seguir é apresentada a distribuição da probabilidade nesta etapa

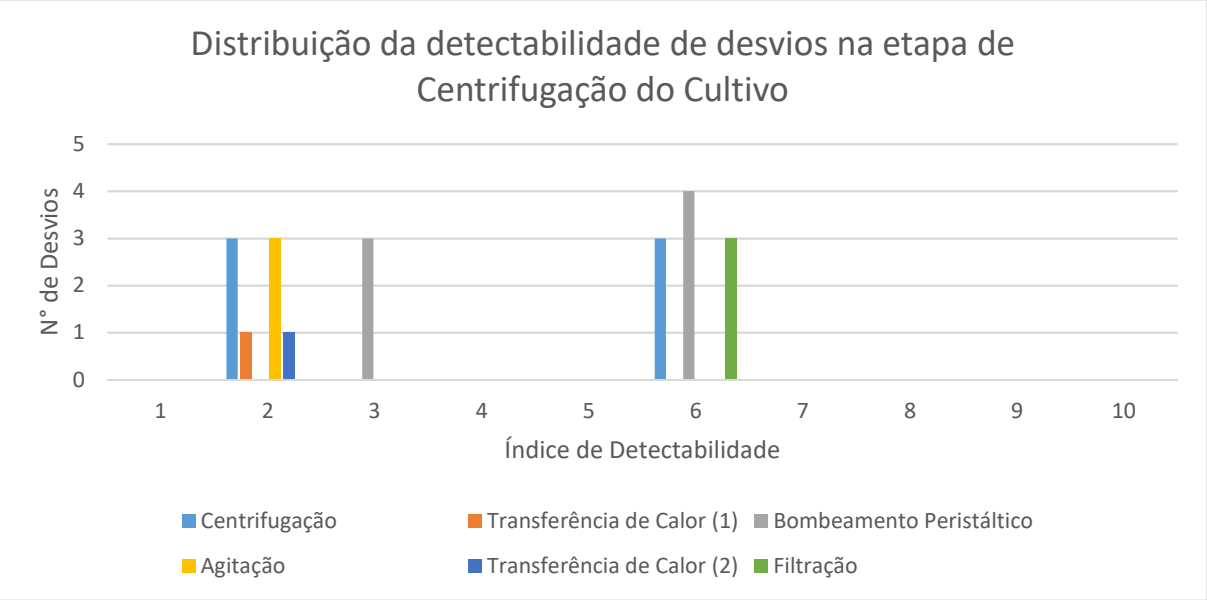
- < 1 vez a cada 4 processos 43%
- < 1 vez a cada 10 processos 19%
- Incomum 38%

III - Detecção

A avaliação do nível de detecção para esta etapa do processo, é apresentada na Figura 34, com a seguinte distribuição.

- Baixa 48%
- Elevada 14%
- Muito Elevada 38%

Figura 34 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de centrifugação do cultivo.



Fonte: O autor, 2016.

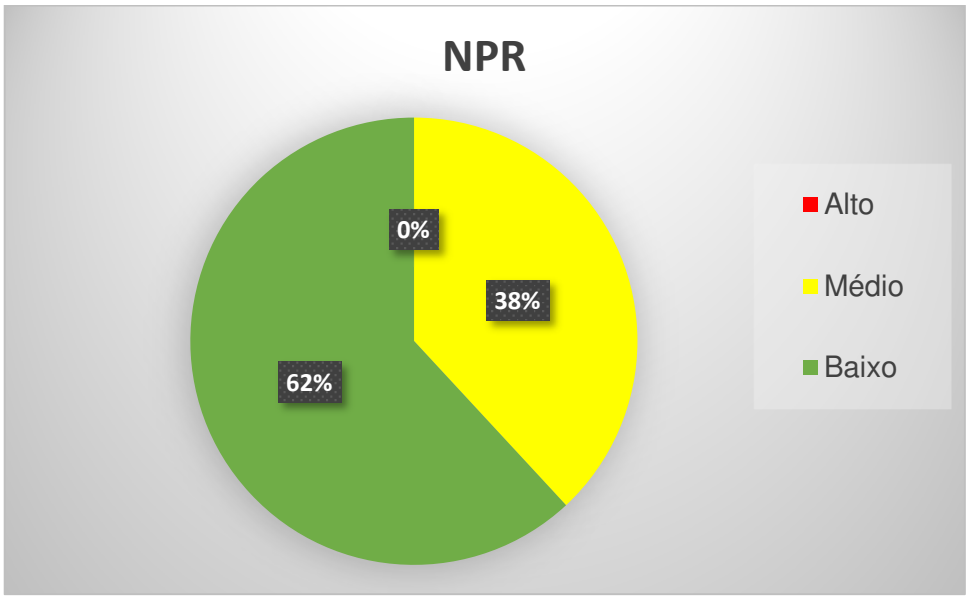
Segundo os dados da figura, podemos perceber que a maioria dos eventos têm alta probabilidade de serem detectados. O alto nível de detecção de falhas e desvios no sistema, podem ser também uma consequência da interligação do sistema. Uma vez que os dispositivos de controle do sistema de biorreação, oferecem informações de monitoramento de parâmetros de operação, essas informações e medidas podem

ser utilizadas como monitoramento em toda a etapa, complementando assim a capacidade de detecção de falhas e desvios (PUNZ et al.). No caso da detecção baixa, é explicável uma vez que são utilizados procedimentos manuais que podem identificar a falha caso esta acontecer (de igual forma que na propagação celular), no entanto, sempre é recomendável que existam procedimentos automatizados ou informatizados de detecção.

IV - NPR.

Com os valores do nível de risco e da detectabilidade, foi calculado o número de priorização de risco para a etapa de centrifugação do cultivo. Na Figura 35 é apresentada a distribuição do NPR para esta etapa.

Figura 35 - Distribuição do NPR na etapa de centrifugação do cultivo celular.



Fonte: O autor, 2016.

Dentre os NPR considerados como prioritários para atendimento nesta etapa destacam-se:

- Nó 1 – Tempo (menos): NPR = (S*P) 35 * (D) 6 = **168**
- Nó 1 – Nível (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **144**
- Nó 3 – Volume (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **144**
- Nó 6 – Vazão (não): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **144**
- Nó 6 – Vazão (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **144**
- Nó 6 – Vazão (mais): NPR = (S*P) 40 * (D) 6 = **192**

Estes valores podem ser explicados se for considerado que operadores são responsáveis por etapas manuais, e que ainda que a operação do equipamento seja simples (WALKER; SHELLEY, 2010), não existem medidas de detecção de falhas potenciais durante a operação. Por outro lado, a partir dos valores médios de NPR, é possível concluir que mesmo existindo procedimentos já estabelecidos para esterilização do sistema, mudanças nos parâmetros, tais como o tempo necessário para atingir a temperatura de esterilização, que de acordo com Boeck et al (1989) tem que ser mantida como constante para garantir a destruição de microrganismos, depende somente do fornecimento da utilidade, fator que não pode ser controlado dentro da área de processo.

4.3.4 Ruptura Celular

Na Tabela 27, é apresentado o resumo dos nós que compõem a etapa de ruptura celular, e os seus respectivos desvios.

Tabela 27 - Nós da etapa de rompimento celular e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo.

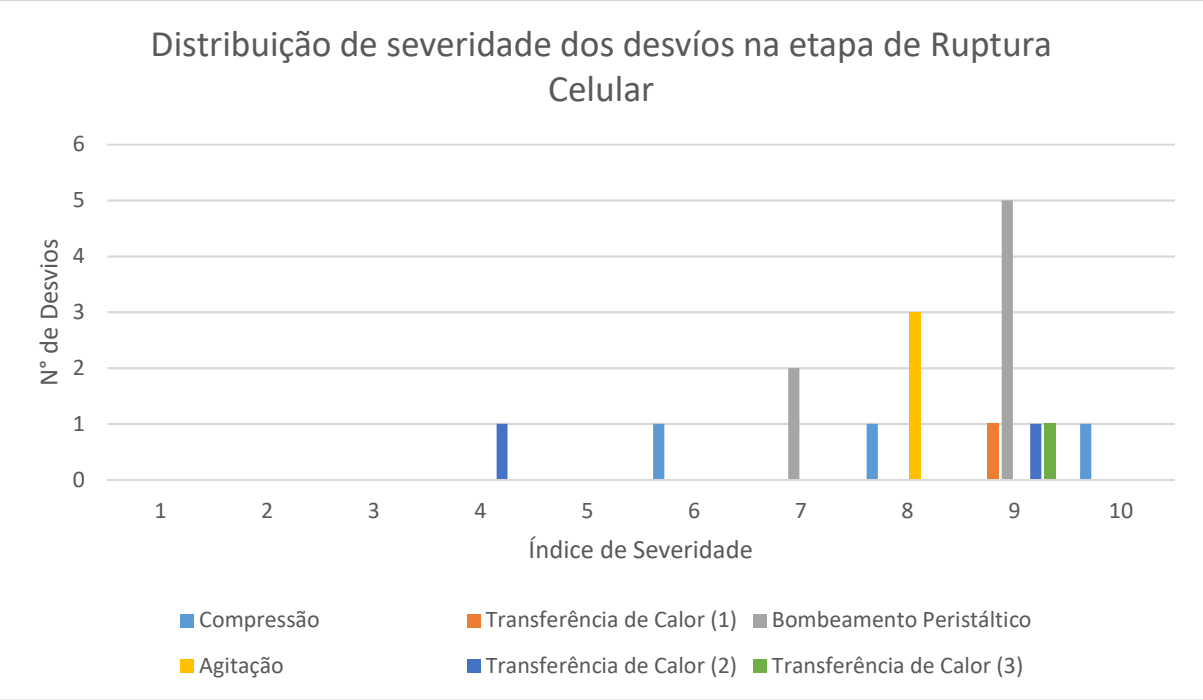
Etapa	Nós	Parâmetro	No de desvios	Palavra guia
Ruptura Celular	Compressão	Pressão	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de Calor (1)	Temperatura	1	Mais
	Bombeamento Peristáltico	Volume	2	Não/Menos
		Rotação	2	Menos/Mais
		Vazão	3	Não/Menos/Mais
	Agitação	Velocidade	3	Mais/Menos/Mais
	Transferência de Calor (2)	Temperatura	2	Mais/Menos
	Transferência de Calor (3)	Temperatura	1	Mais

Fonte: O autor, 2017.

I –Severidade

Na etapa de ruptura celular para recuperação dos corpos de inclusão foram definidos 06 nós e identificados 17 desvios. Na Figura 36 mostra-se a definição do nível de severidade dos desvios, sendo:

Figura 36 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de ruptura celular.



Fonte: O autor, 2016.

A partir do gráfico, é possível perceber que quando a operação do principal equipamento (homogeneizador de alta pressão)é realizada utilizando parâmetros diferentes dos estabelecidos nos protocolos de operação a severidade é catastrófica. Carreño et al (2011), estabelecem que quando o equipamento opera no limite da sua capacidade durante períodos extensos de tempo, existe a clara possibilidade de danificar gravemente o equipamento. Esse é o motivo pelo qual o nível severidade dos desvios tem um perfil tão elevado. Desta forma a severidade foi classificada da seguinte forma.

- Catastrófico 6%
- Crítico 47%
- Muito Alto 24%
- Alto 12%
- Moderado 6%
- Muito Baixo 6%

Sendo o homogeneizador de alta pressão um sistema totalmente customizado, de alta complexidade e com parâmetros específicos de operação, as falhas podem afetar diretamente o seu funcionamento, e comprometer o processo. Outro fator que incrementa a severidade dos desvios, é a perda de produto. Ainda que o volume processado nesta etapa é significativamente inferior ao gerado em etapas anteriores

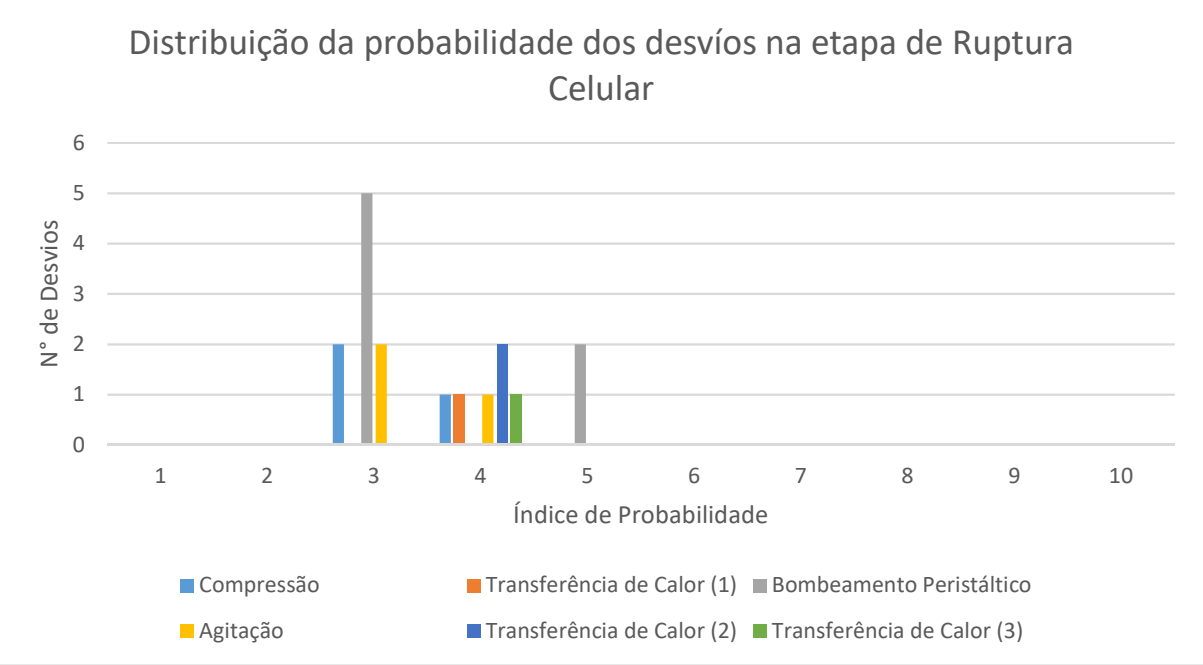
(após a centrifugação o volume pode ser reduzido até a décima parte do volume original), segundo estipulado por Carpenter, Hesterberg e Randolph (2005), os produtos intracelulares são liberados após a ruptura, portanto, pequenas perdas de volume são altamente significativas em relação a perda de produto (corpos de inclusão).

II - Probabilidade

O perfil da probabilidade de desvios na etapa de ruptura é apresentado na Figura 37, aqui é possível observar a seguinte distribuição da probabilidade de eventos.

- < 1 vez a cada 4 processos 12%
- < 1 vez a cada 10 processos 35%
- Incomum 53%

Figura 37 - Distribuição da probabilidade dos desvios na etapa de ruptura celular.



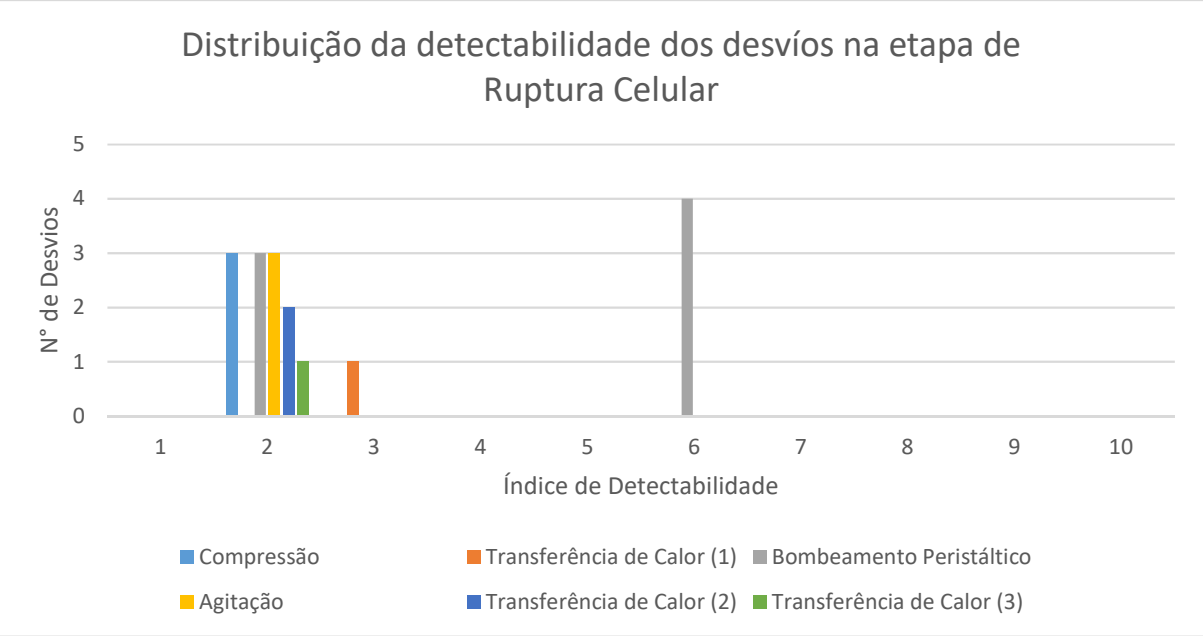
Fonte: O autor, 2016.

A tendência de a probabilidade de desvios ser baixa, pode ser explicada a partir do elevado nível de automação utilizado no sistema, e do tempo de processamento, que é relativamente curto em proporção com o tempo necessário durante as etapas de biorreação e centrifugação do cultivo (GALL; RUNDE; SCHUCHMANN, 2016), permitindo assim verificar a integridade dos sistemas e equipamentos envolvidos na etapa no intervalo entre lotes.

III - Detecção

A avaliação das características dos sistemas e dispositivos de controle permitiu estabelecer o nível de detectabilidade representado na Figura 38.

Figura 38 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de ruptura celular.



Fonte: O autor, 2016.

Desta forma, a seguir pode ser observada a distribuição do nível de detecção na etapa:

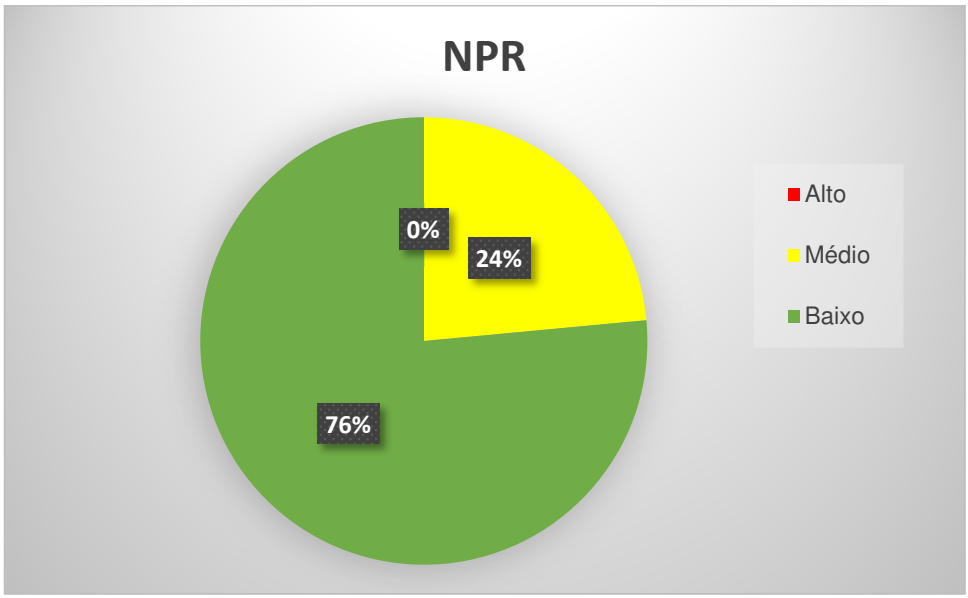
- Baixa 24%
- Elevada 6%
- Muito Elevada 71%

Ainda que a maioria dos desvios possam ser facilmente detectados pelos sistemas de controle, os níveis de baixa detecção são um elemento critico que precisa ser aprimorado para aumentar a detecção. Foi observado que esta deficiência de detecção de falhas é uma característica do sistema de bombeamento (bombas peristálticas) utilizado nesta etapa. Entretanto uma característica deste sistema, éa capacidade de identificação de falhas por dispositivos de monitoramento instalados em outros equipamentos, tal qual relatado po rPetrovskiy et al (2015), em que a integração de elementos de monitoramento e controle entre equipamentos, favorece capacidade de detecção de falhas do sistema.

IV- NPR. A priorização do tratamento dos riscos na etapa de ruptura é apresentada na Figura 39, e foi calculada a partir do nível de risco e pela detecção. A partir desta premissa, foi esperado que os valores NPR maiores, fossem para os desvios do homogeneizador de alta pressão (LIU; DENG; JIANG, 2017), no entanto, a eficiência de detecção no equipamento, e a baixa ocorrência, fez permanecer os desvios dentro da região aceitável. No entanto, novamente o nó de bombeamento peristáltico, no parâmetro de **"volume e rotação",** apresentaram o nível de risco mais elevado dos desvios, sendo:

- Nó 3 – Volume (não): NPR = (S*P) 27 * (D) 6 = **162**
- Nó 3 – Volume (menos): NPR = (S*P) 45 * (D) 6 = **270**
- Nó 3 – Rotação (menos): NPR = (S*P) 27 * (D) 6 = **162**
- Nó 3 – Rotação (mais): NPR = (S*P) 31 * (D) 6 = **126**

Figura 39 - Distribuição do NPR na etapa de ruptura celular.



Fonte: O autor, 2016.

É importante destacar que na etapa foram identificados dois desvios com nível de severidade classificados como catastrófico (homogeneizador de alta pressão). Normalmente durante a avaliação de risco por metodologias convencionais, estes desvios seriam mandatórios para serem elencadas medidas de mitigação importantes e resolutivas. Entretanto, pode ser observado que a alta capacidade de detecção que existe no sistema, somado à baixa probabilidade de acontecer, fez diminuir o nível de priorização, e estabeleceu que o risco não é prioritário para tratamento, uma vez que

os controles para detecção, satisfazem as necessidades de segurança para o processo.

4.3.5 Centrifugação e Lavagem

Na Tabela 28, é apresentado o resumo dos nós que compõem a etapa de centrifugação e lavagem dos corpos de inclusão, e os seus respectivos desvios.

Tabela 28 - Nós da etapa de centrifugação e lavagem, e seus respectivos desvios nos parâmetros de processo.

Etapa	Nós	Parâmetro	No de desvios	Palavra guia
Centrifugação e Lavagem	Centrifugação	Velocidade	3	Não/Menos/Mais
	Transferência de Calor (1)	Temperatura	1	Mais
	Agitação	Velocidade	3	Mais/Menos/Mais
	Transferência de Calor (2)	Temperatura	2	Menos/Mais
	Bombeamento Peristáltico	Volume	2	Não/Menos
		Rotação	2	Menos/Mais
		Vazão	3	Não/Menos/Mais
	Filtração	Vazão	3	Não/Menos/Mais

Fonte: O autor, 2017.

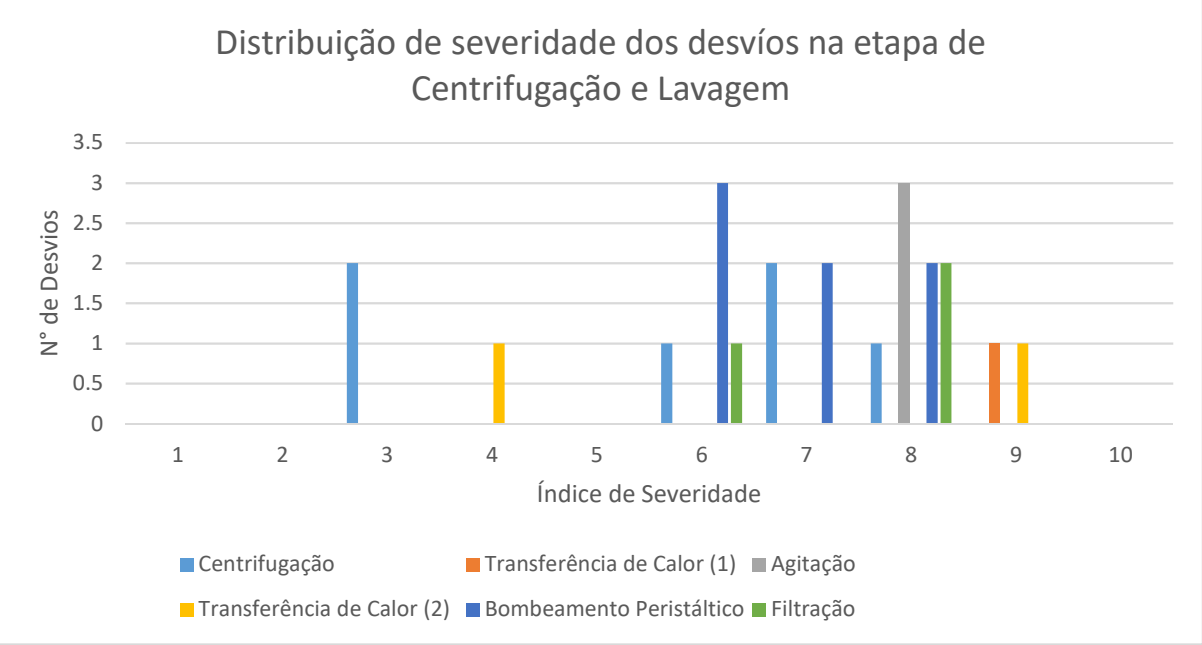
I – Severidade

Nesta última etapa do processo de produção de biomassa recombinante, foram identificados 06 nós e 22 desvios. O resultado da avaliação da severidade dos desvios foi similar ao perfil estudado na centrifugação do cultivo, é apresentado na Figura 40.

Assim, o perfil de severidade do sistema foi classificado como.

- Crítico 9%
- Muito Alto 36%
- Alto 18%
- Moderado 23%
- Muito Baixo 5%
- Menor 9%

Figura 40 - Distribuição da severidade dos desvios na etapa de centrifugação e lavagem.



Fonte: O autor, 2016.

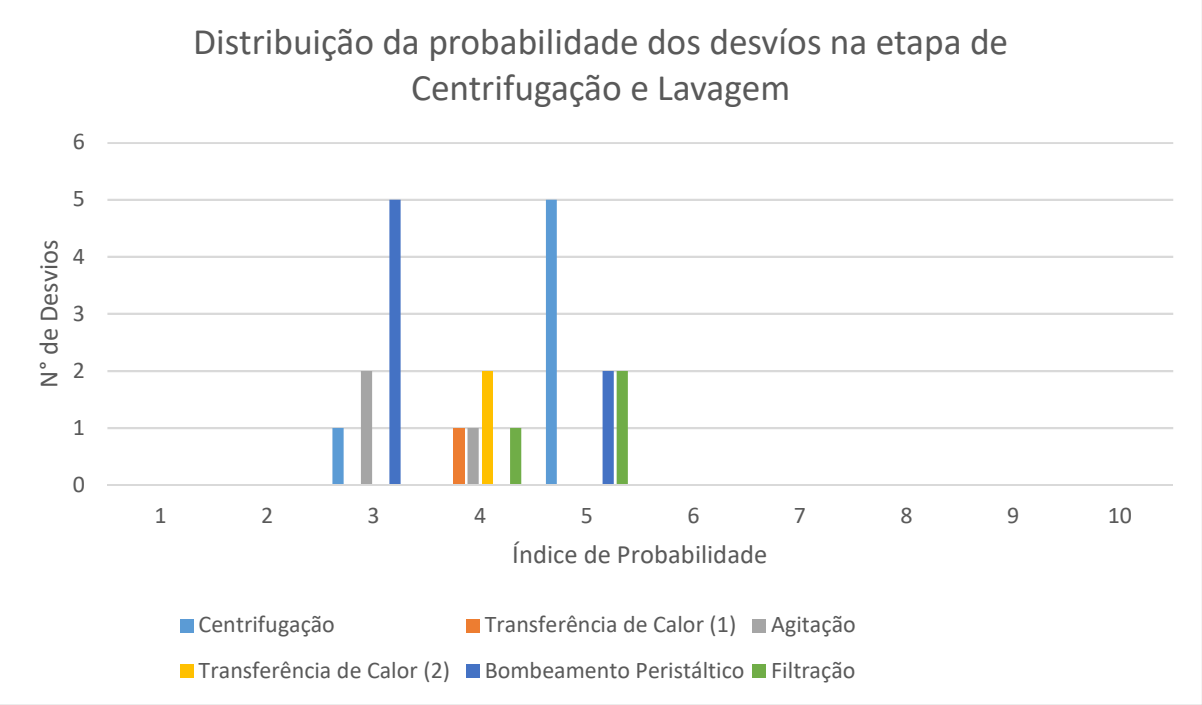
Como pode ser observado, existe uma tendência de desvios de severidade considerável, que podem ser resultado de falhas que representam impactos regulatórios e perdas de produto. Considerando que a maioria das operações unitárias utilizadas em esta etapa são destinadas para a inativação de sobrenadante necessária para processos biotecnológicos segundo sinalizado por Pan et al (2016), e para a esterilização dos equipamentos, os desvios conduziriam a descumprimentos regulatórios, e não conformidades, que na indústria farmacêutica não podem ser aceitos e são classificados como críticos.

II – Probabilidade

Na Figura 41, é apresentada a avaliação da probabilidade dos desvios nesta etapa. Seguindo a seguinte distribuição.

- < 1 vez a cada 4 processos 41%
- < 1 vez a cada 10 processos 23%
- Incomum 36%

Figura 41 - Distribuição da frequência dos desvios na etapa de centrifugação e lavagem.



Fonte: O autor, 2016.

Este perfil de baixa e moderada probabilidade principalmente, é o reflexo da baixa frequência de utilização dos sistemas durante as campanhas de produção, e o cumprimento dos parâmetros utilizados segundo os procedimentos de operação. Drożyner e Veith (2002) estabelecem que a qualificação dos equipamentos antes da operação de rotina ajuda na detecção de falhas e desta forma reduz consideravelmente a probabilidade de que aconteçam ao longo do processo.

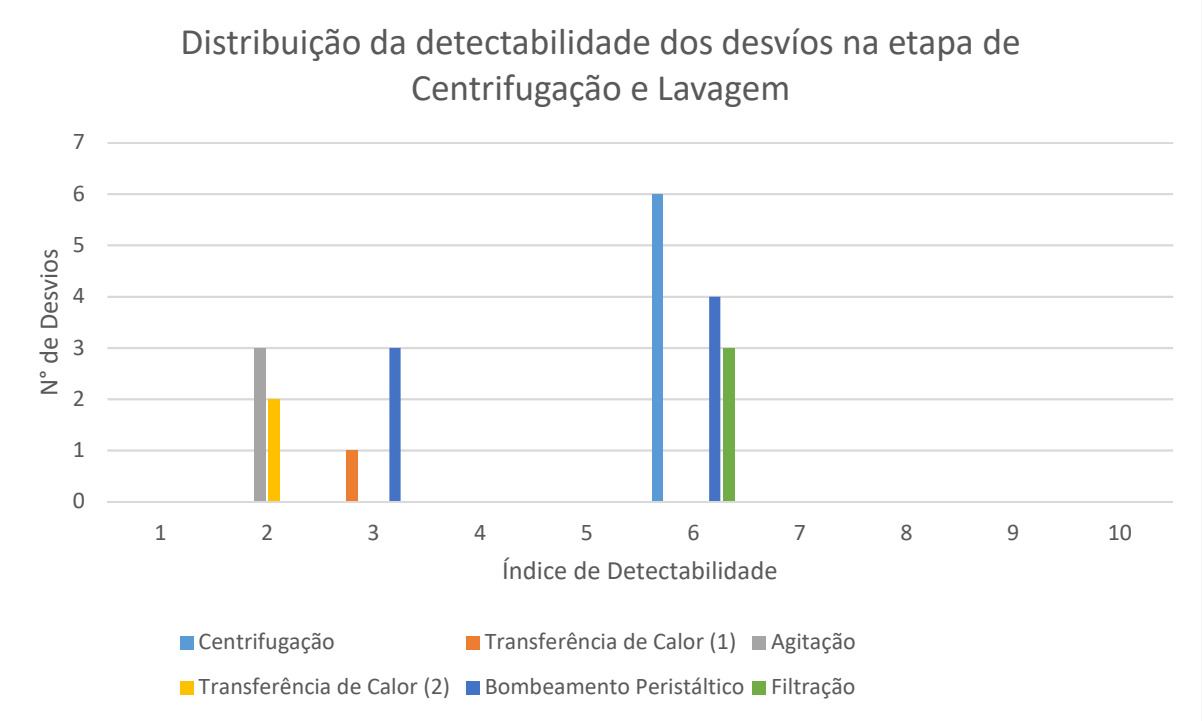
III – Detecção

Finalmente a avaliação da detectabilidade neste sistema representado na Figura 42foi definida da seguinte forma:

- Baixa 59%
- Elevada 18%
- Muito Elevada 23%

A soma dos eventos com baixa detectabilidade é aproximadamente do 59% do total de desvios identificados, é recomendado aplicar medidas de monitoramento ou sistemas de detecção de falhas para aqueles sistemas, os equipamentos que não possuem dispositivos que permitam a identificação rápida e eficiente das falhas.

Figura 42 - Distribuição do nível de detectabilidade na etapa de centrifugação e lavagem.



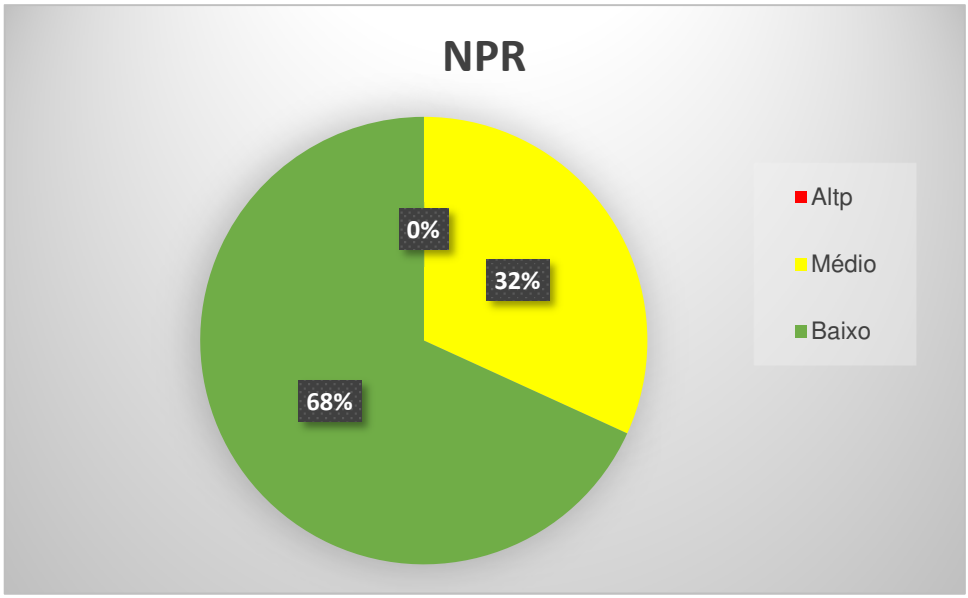
Fonte: O autor, 2016.

IV –NPR

Pode ser observado na Figura 43, que o perfil de NPR obedece ao comportamento dos nós calculados anteriormente. Assim, a avaliação de NPR confirma a premissa que na maioria dos casos, o NPR é categorizado como baixo para esta etapa, ainda assim, os desvios considerados como prioritários para tratamento serão citados a continuação.

- Nó 1 – Tempo (menos): NPR = (S*P) 35 * (D) 6 = **210**
- Nó 1 – Vazão (não): NPR = (S*P) 24 * (D) 6 = **144**
- Nó 1 – Vazão (mais): NPR = (S*P) 35 * (D) 6 = **210**
- Nó 1 – Nível (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **180**
- Nó 5 – Volume (não): NPR = (S*P) 24 * (D) 6 = **144**
- Nó 5 – Volume (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **180**
- Nó 5 – Rotação (mais): NPR = (S*P) 21 * (D) 6 = **126**
- Nó 6 – Vazão (não): NPR = (S*P) 32 * (D) 6 = **192**
- Nó 6 – Vazão (menos): NPR = (S*P) 30 * (D) 6 = **180**
- Nó 6 – Vazão (mais): NPR = (S*P) 40 * (D) 6 = **240**

Figura 43 - Distribuição do NPR na etapa de centrifugação e lavagem



Fonte: O autor, 2016.

Como pode ser percebido na avaliação dos desvios para esta etapa, a severidade e probabilidade são similares as encontradas para o mesmo equipamento em etapas anteriores (centrifugação do cultivo). De fato, ambas as duas etapas, concentram o maior número de NPRs considerados como médio. No entanto, é a baixa capacidade de detecção de falhas que é responsável pelo NPR elevado, este argumento foi baseado considerando a análise de Jiang et al (2016) na avaliação dos efeitos da capacidade de detecção no NPR. Considerando o alto valor destes desvios, é mandatório que sejam tratados prioritariamente cumprindo com as premissas estabelecidas pela metodologia integrada proposta neste trabalho.

4.4 Análise dos efeitos da probabilidade calculada com matrizes de Markov no nível de risco e NPR.

O intuito de usar uma ferramenta que permitisse diminuir a subjetividade durante a determinação da probabilidade de eventos neste trabalho, foi baseada na proposta apresentada por Sujiao (2009), na qual, a probabilidade inicial de eventos é definida por um grupo de especialistas, e calculada para um período determinado “n”. Uma vez elaborado o relatório de análise de risco, a equipe comprovou que a principal vantagem do modelo de Markov foi a flexibilidade, uma vez uma ampla gama de

critérios multidisciplinares, e experiência do grupo, foram consideradas para construção do modelo.

Este princípio foi previamente estabelecido nos trabalhos de Xiangyu, Jiang e Guozhi (2006), Karimi et al. (2010), Zhang e Bai (2012) em que a versatilidade para tratamento dos dados utilizando as cadeias de Markov, facilitaram o alto grau de incertezas do comportamento dos sistemas estudados. A utilização de cadeias de Markov e matrizes de transição para determinação de probabilidades numa sucessão de eventos neste trabalho, não é um conceito moderno.

Para Gunnvald (2014), e García-Cespedes e Moreno (2016), a aplicação de cadeias de Markov, permitiu estabelecer os critérios para qualificação de crédito através da inconsistência no comportamento do sistema ao longo do tempo. Da mesma forma, na ausência de registros de eventos anteriores, ou de falhas em sistemas similares, a utilização da matriz de transição de Markov resultou na determinação das probabilidades que podem ser consideradas mais tangíveis para identificar falhas e garantir a segurança de sistemas segundo foi demostrado por Pickard, Muller e Bertsche (2005), Goble, e Cheddie (2005), Yujuan e Xianhui (2007).

É desta forma que a equipe multidisciplinar realizou o cálculo das probabilidades que serviram como base para a realização deste trabalho. Na Tabela 29 é apresentado o cálculo das probabilidades de eventos a partir do 10% até o 90% de probabilidade que o evento aconteça.

Segundo Schumacker e Tomek (2013), Leighton e Rubinfeld (2004), as probabilidades com valor de 0% e100%, não podem ser consideradas para construção do modelo de probabilidade, porque no primeiro caso, existe total certeza que o evento não tem possibilidade de acontecer, já na segunda probabilidade, existe a total certeza que o evento vai se concretizar, transformando em ambos os casos a probabilidade em fato.

Após análise da probabilidade de eventos, foi percebido que a probabilidade igual, ou superior a 60%, não houve diferença entre o valor da probabilidade inicial e a calculada. Uma situação similar foi apresentada por Althoff e Mergel (2011), em que um modelo de Markov ajudou a prever a distribuição probabilística de falhas potenciais em veículos autônomos. Porém, esse modelo foi desfavorável em termos de aplicação em tempo real, dado que, na tentativa de aumentar a precisão do modelo, a duração (tempo) dos ciclos, foi reduzida, ocasionado, no entanto, o incremento do número de ciclos avaliados para ajustar o modelo, portanto, a diferença da probabilidade entre estágios foi ínfima.

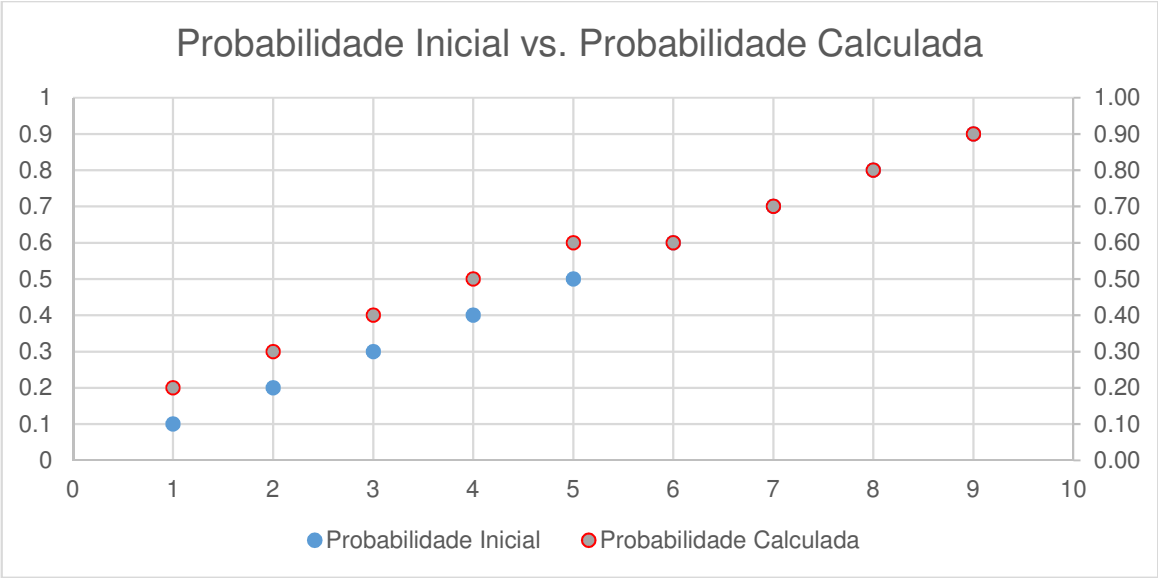
Tabela 29 - Probabilidade calculada a partir da matriz de transição de Markovpara análise de risco da metodologia integrada HAZOP e FMEA.

P_i	P_1		P_2		P_3		P_n		$P_{estável}$	P_f
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não		
0,1	0,10	0,90	0,19	0,81	0,18	0,82	0,18	0,82	0,20	**0,2**
	0,20	0,80	0,18	0,82	0,18	0,82	0,18	0,82	0,20	
0,2	0,30	0,70	0,28	0,72	0,27	0,73	0,27	0,73	0,30	**0,3**
	0,35	0,65	0,27	0,73	0,27	0,73	0,27	0,73	0,30	
0,3	0,30	0,70	0,37	0,63	0,36	0,64	0,36	0,64	0,40	**0,4**
	0,40	0,60	0,36	0,64	0,36	0,64	0,36	0,64	0,40	
0,4	0,40	0,60	0,46	0,54	0,45	0,55	0,45	0,55	0,50	**0,5**
	0,50	0,50	0,45	0,55	0,45	0,55	0,45	0,55	0,50	
0,5	0,50	0,50	0,55	0,45	0,55	0,45	0,55	0,45	0,60	**0,6**
	0,60	0,40	0,54	0,46	0,55	0,45	0,55	0,45	0,60	
0,6	0,60	0,40	0,64	0,36	0,64	0,36	0,64	0,36	0,60	**0,6**
	0,70	0,30	0,63	0,37	0,64	0,36	0,64	0,36	0,60	
0,7	0,70	0,30	0,73	0,27	0,73	0,27	0,73	0,27	0,70	**0,7**
	0,80	0,20	0,72	0,28	0,73	0,27	0,73	0,27	0,70	
0,8	0,80	0,20	0,82	0,18	0,82	0,18	0,82	0,18	0,80	**0,8**
	0,90	0,10	0,81	0,19	0,82	0,18	0,82	0,18	0,80	
0,9	0,90	0,10	0,91	0,09	0,91	0,09	0,91	0,09	0,90	**0,9**
	1,00	0,00	0,90	0,10	0,91	0,09	0,91	0,09	0,90	

Fonte: O autor, 2017.

De igual forma, neste trabalho foi observado que a variação do valor da probabilidade ao longo do tempo sofreu alterações desprezíveis na probabilidade final, e inclusive, em quase todos os casos, a partir da probabilidade do quarto período analisado (4º lote de 52/ano), a probabilidade permaneceu constante. Segundo Lee (1993), Cole et al. (1995), Wagner (2001), Konstantopoulos (2009), em matrizes de dois estados, a diferença entre o intervalo das probabilidades propostas inicialmente (no nosso caso p_1 = 10% e P_9 = 90%) e as calculadas após aplicar modelo de Markov, torna-se mais estreita na aproximação ao limite superior da probabilidade. Este fenómeno foi observado no cálculo das probabilidades deste trabalho, e pode ser observado na Figura 44.

Figura 44 - Probabilidade inicial proposta vs. a probabilidade calculada pela matriz de Markov.



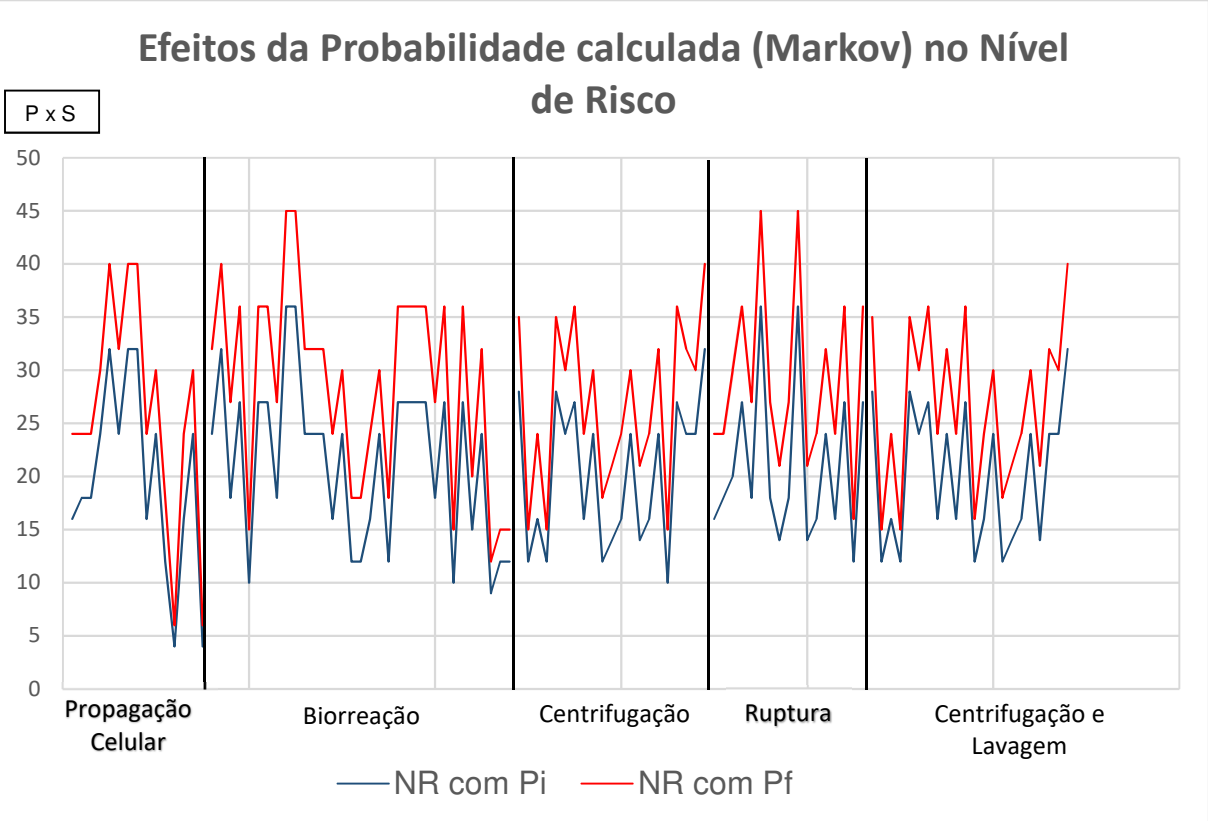
Fonte: O autor, 2017.

Na anterior Figura foi percebido que a diferencia entre o valor das probabilidades inicial e a calculada vai diminuindo na aproximação com a probabilidade limite superior (90%), comprovando desta forma que o modelo atendeu as expectativas da equipe para estabelecer uma probabilidade ajustada em base a um modelo matemático, e para que em conjunto com o índice de severidade fosse utilizado como base para estabelecer o nível de risco e NPR.

Por outra parte, após consenso da equipe, a probabilidade calculada da cadeia de Markov, foi ajustada em dois dígitos, arredondando valores acima de 0,06 ao seguinte dígito (por exemplo 0,36 → 0,40), e inferiores a 0,05 no digito anterior (0,91 → 0,90). Não foi descartado que essa decisão influenciaria no perfil da probabilidade calculada. Além disso, foi percebido que o aumento do índice de ocorrência em quase todos os casos, foi no máximo de 1 nível, fato que pode ser observado no cálculo do nível de risco e NPR.

Desta forma, na Figura 45, são apresentados os efeitos da utilização da probabilidade calculada no estabelecimento do nível de risco dos desvios do sistema de produção de biomassa recombinante. Neste gráfico, a linha azul representa o perfil do nível de risco (NR) considerando a severidade e a probabilidade inicial (Pi) proposta pela equipe de especialistas, e em contraste, a linha vermelha representa o perfil nível de risco (NR) utilizando a probabilidade calculada com a matriz de Markov (Pf).

Figura 45 - Efeitos da probabilidade calculada no nível de risco (NR) = S x P.



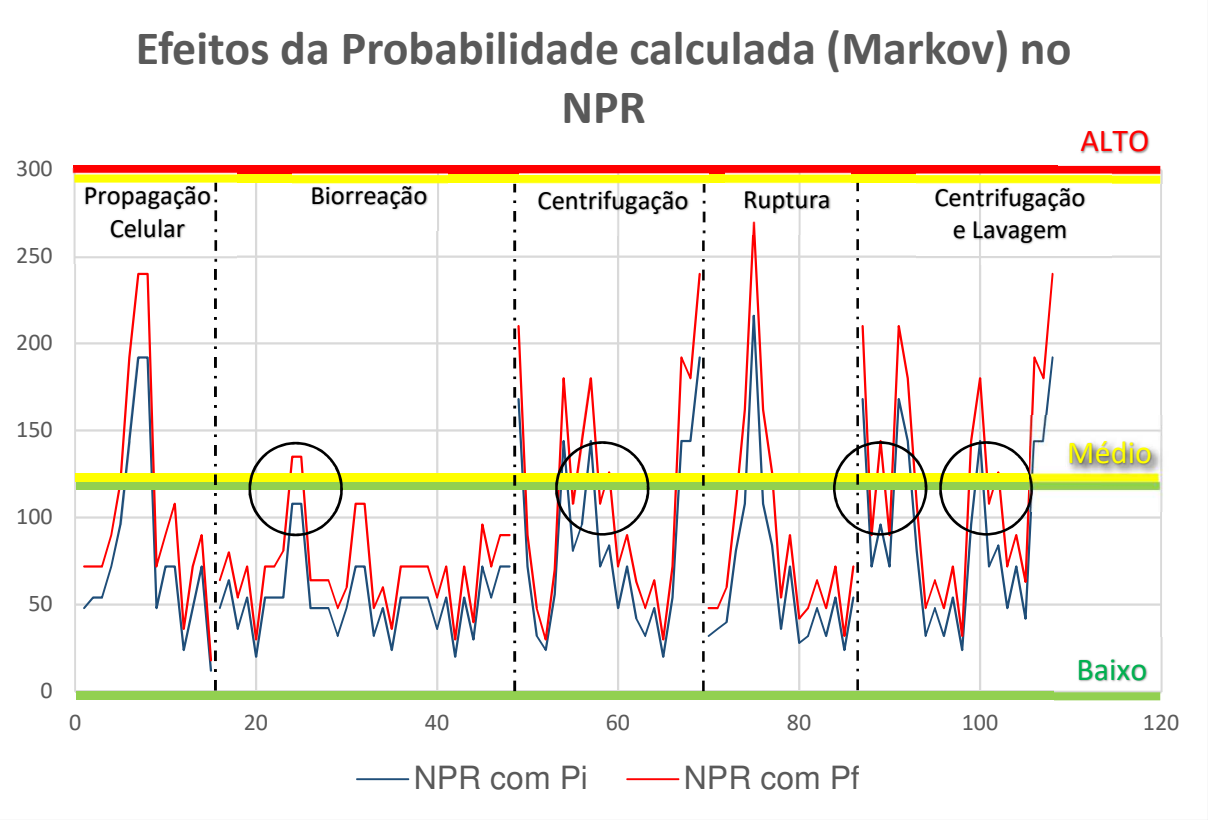
Fonte: O autor, 2017.

Como pode ser constatado na Figura anterior, existe uma clara diferença entre o nível de risco definido a partir da probabilidade proposta pela equipe, e aquela calculada através do modelo de Markov. Conforme sinalizado por Morgan et al. (2000), Ruge (2004), Zhao e Zhang (2005), Markowski e Mannan (2008), Murray, Sha, Hangjun e Yezhi (2011), Grantham, e Damle (2011), Lyon e Hollcroft (2012), Dumbravă (2013), Iacob (2014), Jawab e Arif (2015), Knuston e Huettel (2015), Peace (2017) entre outros, este resultado pode ser facilmente explicado se lembramos que o Nível de Risco é o produto resultante do índice de severidade multiplicado pelo índice de probabilidade. Portanto, o aumento de qualquer das duas variáveis, influenciara diretamente no incremento do nível de risco.

Complementarmente, foi realizada uma avaliação dos efeitos da probabilidade calculada no Número de Priorização de Riscos (NPR). Visto que o NPR é o resultado do produto da Probabilidade (P), a Severidade (S), e a Detecção (D), (JOHNSON; KHAN, 2000; FERNANDES; REBELATO, 2006; BASTOS, 2006; SEGISMUNDO; MIGUEL, 2008; AIAG, 2010), o número de priorização de riscos aumenta proporcionalmente quando um ou mais dos três elementos que o compõem

aumenta. A divergência entre o NPR considerando a probabilidade inicial (NPR com Pi) e a probabilidade calculada (NPR com Pf), é apresentada na Figura 46.

Figura 46 - Efeitos da probabilidade calculada com matriz de Markov no NPR.



Fonte: O autor, 2017.

Com base na anterior figura, foi observado que somente em quatro desvios, sendo 1 na biorreação, 1 na centrifugação do cultivo, e 2 na etapa de centrifugação e lavagem dos corpos de inclusão, o Número de Priorização de Risco aumentou de categoria, passando de “NPR Baixo”, a “NPR Médio”. Tendo em conta que mediante a análise de risco foram identificados108 desvios no sistema completo, a mudança de categoria de NPR representa somente o 3.7% do total de desvios. Assim sendo, a equipe concluiu que a probabilidade calculada neste trabalho, produz efeitos que podem ser considerados como insignificantes na determinação do NPR.

Entretanto, é importante destacar que as categorias de NPR nas quais este trabalho foi fundamentado (Baixo, Médio, Alto),não são absolutas para todas análises de riscos destinadas para determinar a priorização de tratamento de riscos. Por exemplo, para o Grupo de Ação da Industria Automotiva (AIAG, 2008), o nível de

aceitação de riscos abrange o intervalo de NPR de 1 até 100, e a partir de 101 até 1000, o nível de risco é considerado como inaceitável.

Em outro caso, o MS da Singapura (2016), através do seu guia de gestão de risco, estabelece o NPR(valor resultante da multiplicação da S, O, e D, em 5 níveis), como baixo se: NPR <= 5, médio se: 5 < NPR <=15, e finalmente como alto o NPR > 15. De igual forma, Vincent e Honeck (2004), utilizam os mesmos 5 níveis para definir o NPR (NPR_{max} = 125), mas para eles, valores iguais ou acima de 50, serão considerados como críticos, e candidatos a serem tratados prioritariamente. Adicionalmente, na maioria das pesquisas relacionadas com a determinação do NPR, a classificação desse número não está definida, permitindo aos especialistas tomar arbitrariamente as decisões de estabelecer os limites que determinem quando um NPR é alto, médio e baixo (Le SAUX, 2006, LIPOL; HAQ, 2011, BROGGI et al., 2013, MANGER et al., 2015, RAH et al. 2016).

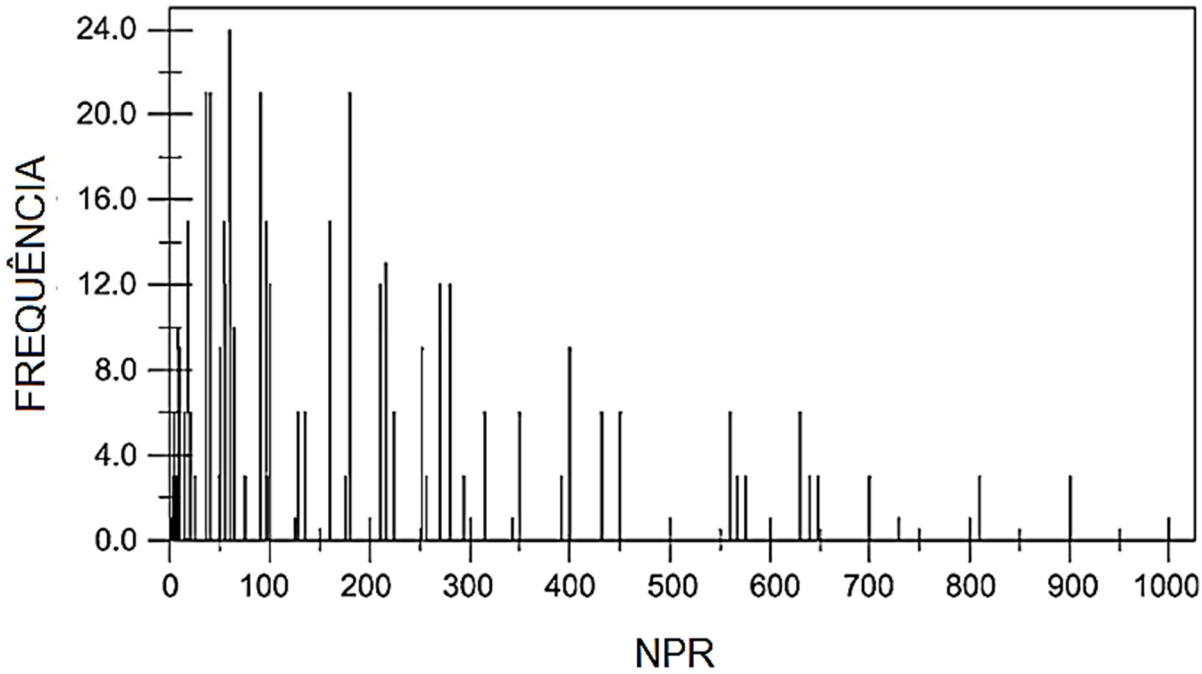
Uma questão interessante muitas vezes é ignorada por especialistas, é que alguns números não podem ser um NPR. Muitas pessoas têm a crença equivocada de que qualquer número entre 1 e 1.000 pode ser uma NPR. O número 19 por exemplo, não pode ser um NPR, porque é um número primo maior do que 10. Isto é explicado simplesmente porque não é possível multiplicar 3 números de 1 a 10 que resultem em 19. Sendo assim, existe um número limitado de NPRs. Na Tabela 30,Yang (2007) estabelece a distribuição de NPR em sistemas 10 x 10 x 10, e na Figura 47,Wang e Bi (2013) apresentam o histograma desta distribuição.

Tabela 30 - Distribuição de valores de NPR em sistemas 10 x 10 x 10.

INTERVALO	NPR	PORCENTAGEM
[1,200]	67	55,8
(200,400]	26	21,7
(400,600]	17	14,2
(600,800]	7	5,8
(3,1000]	3	2,5

Fonte: Yang, 2007.

Figura 47 - Histograma dos NPR considerando todas as possíveis combinações de severidade, probabilidade e detecção.



Fonte: WANG; Bi, 2013.

A partir dessas informações facilmente pode ser percebido que a região com maior número de NPR fica no intervalo de 1 até 400. Conforme mostrado no gráfico de NPR dos desvios analisados neste trabalho, o intervalo que mais representa o sistema estudado varia de 50 até 250 estando totalmente dentro dos limites de aceitação de NPR. De qualquer forma, espera-se que nas avaliações de risco, o NPR não ultrapasse esse limite.

Complementarmente, foi observado que os NPR podem ser obtidos de várias formas, por exemplo, podemos considerar o número 120. Existem 24 maneiras diferentes de este número se tornar um NPR. Para comprovar este conceito, consideramos o seguinte cálculo, onde (S) (P) (D) = (2) (6) (10) = (8) (5) (3) = (5) (4) (6), etc. = 120. No primeiro caso, a severidade está perto do fundo da escala (2), enquanto no segundo caso, a gravidade está próxima do topo da escala (8), mas em ambos os casos o resultado da multiplicação é o mesmo. Além disso, foi percebido que existem longos trechos de números que não podem ser NPR. Por exemplo, nenhum dos números entre 901 a 999 é um NPR. Assim, podemos confirmar o fato que existem apenas 120 valores de NPR, possíveis (CHANG; CHENG, 2011, WHEELER, 2011, GARCIA, 2013 e UNGUREANU; STAN, 2016).

Como ponto final, durante a execução deste trabalho foi percebido que o NPR não é uma medida de risco, e sim um critério para priorização de riscos. NPRs maiores, precisam de mais priorização, por exemplo, deve-se trabalhar para atender um NPR = 280, antes de colocar recursos em um NPR =18, independentemente da sua classificação.

CONCLUSÕES

A aplicação de uma metodologia integrada a partir das ferramentas de análise de risco HAZOP e FMEA ofereceu o suporte necessário para identificar as operações unitárias mais críticas que compõem o sistema de produção de biomassa recombinante, além de ajudar na determinação dos riscos que precisam ser atendidos prioritariamente.

A integração das ferramentas na metodologia aplicada ajudou a definir e justificar tecnicamente potenciais falhas no sistema, e assim, identificar desvios não desejados, os seus efeitos, e propor medidas de monitoramento desenhadas para evitá-las, ou trata-las quando seja inevitável que aconteçam.

Neste trabalho foi constatado que a priorização de tratamento dos desvios com baixa capacidade de detecção, não descarta a necessidade de tratar todos os riscos identificados como não desejáveis (independente do índice de alta detectabilidade de falhas), aplicando as medidas de mitigação correspondentes que permitam a redução deste nível. Os Números de Priorização de Riscos (NPRs) que foram calculados durante a avaliação de cada uma das etapas que compõem este processo, sugerem somente a ordem em que os riscos resultantes deverão ser atendidos. Consequentemente, os riscos de maior índice de NPR, serão considerados como os elementos de maior criticidade do sistema e, portanto, serão o objeto de aplicação dos testes necessários durante o processo de qualificação da planta.

A partir da determinação da severidade e probabilidade dos desvios, foi possível determinar que o conhecimento do processo, e sistemas correlacionados, é fundamental para aplicação da metodologia. Uma vez que ao longo do processo as operações unitárias são utilizadas em repetidas ocasiões, o domínio do processo permite caracterizar e quantificar as falhas no sistema, em virtude de o nível de risco não ser precisamente igual entre essas operações. No entanto, é possível perceber que aquelas operações que dependem diretamente da manipulação de operações manuais, a detectabilidade é baixa, e, portanto, os valores de NPR são maiores. Adicionalmente, foi observado que a proposta de utilizar modelos probabilísticos, tais como as matrizes de transição de Markov, reforçou os critérios propostos inicialmente pela equipe multidisciplinar. No entanto, a diferença da probabilidade inicial sugerida pelo grupo, e o índice calculado através do modelo, não apresentou mudanças significativas. Além disso, durante operação de rotina, dados e registro de eventos

serão gerados, e a probabilidade será transformada em frequência, tornando irrelevante a probabilidade calculada. Conforme visto neste trabalho, o desenho de um modelo Markoviano, demanda tempo e recursos, que comumente na indústria, não estão disponíveis. Portanto a utilização das cadeias de Markov para determinação da probabilidade é recomendada somente em caso que a equipe multidisciplinar não tenha nenhuma expertise ou conhecimento do sistema, ou quando tenha total incerteza dos critérios a seguir para estimara ocorrência dos eventos em longos períodos de tempo.

Uma vez que a instalação da Planta de produção de biomassa recombinante estudada neste trabalho está próxima de ser concluída, e que todos os equipamentos necessários para o processo já foram desenhados e construídos e instalados, torna-se inviável a aplicação de ações para redução dos riscos que considerem mudanças ou modificações estruturais nos equipamentos. No entanto, este trabalho servirá de base para mapeamento dos pontos críticos para o processo de qualificação dos equipamentos envolvidos no processo de produção de biomassa recombinante e servirá de modelo para processos similares, ganhando-se tempo e dinamismo nos processos de qualificação. Desta forma, a aplicação das ações que envolvem implementação de procedimentos operacionais, treinamentos, aplicação de testes de validação, etc., serão priorizadas para redução de riscos.

Perspectivas do Trabalho.

Para 2018, está planejado o início da qualificação dos sistemas estudados neste trabalho, começando com o sistema de biorreação (etapa Biorreação). Previamente, esta análise será adicionada ao dossiê de qualificação. Assim, durante os testes correspondentes, o relatório de análise de risco das ferramentas integradas, poderá ser desafiado *in loco*, durante a qualificação do sistema.

REFERÊNCIAS

ABADIE, L.M.; GALARRAGA, I.; MURIETA, E.S. Understanding risks in the light of uncertainty: low-probability, high-impact coastal events in cities. *Environ. Res. Lett.*, v. 12, p.1-7, 2017.

AHMAD-RAUS, R.; MEL, M.; MOHD-ABDULLAH, S.N.; YUSOFF, K. Cell Rupture of Recombinant *Escherichia coli* using High Pressure Homogenizer. *J. Appl. Sci.*, v. 10 n. 2, p. 2717-2720, 2010.

AIAG - Automotive Industry Action Group. *Análise de Modo e Efeito de Falha Potencial (FMEA)*. Manual de Referência, 4ª edição, 2008.

AIAG, Potential Failure Mode & Effects Analysis FMEA Reference Manual (4th Edition), 2008. Disponível em: <https://daimler.portal.covisint.com/documents/14372879/14492753/Guidelines+for+making+PFMEA_a.pdf/67cc191c-fccd-4f5b-aaf9-20a4ef1c97c9">. Acesso em: 21 mar. 2017.

AKPA, J. G.; OKOROMA, J. U. Pinch Analysis of Heat Exchanger Networks in the Crude Distillation Unit of Port-Harcourt Refinery. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, v. 3, n. 3, p. 475-484, 2012.

ALTAMIRANO C.; BERRIOS J.; VERGARA M.; BECERRA S. Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron. J. Biotechnol.*, v. 16, n. 3, May 15, 2013.

AMAYA, O.M.; BARRAGÁN, M.T.C.; TAPIA, F.J.A. *Microbial biomass in batch and continuous system, biomass now — sustainable growth and use*. Miodrag Darko Matovic (Ed.), 2013.

AMBEKAR, S.B.; EDLABADKAR, A.; SHROUTY, V. A Review: Implementation of Failure Mode and Effect Analysis. *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT),* v. 2, Issue 8, p.37-41, 2013.

ANASTAS, M. Y. *Engineering and Other Health Hazard Controls in Oral Contraceptive Tablet-Making Operations*. NIOSH, NTIS Pub. No. PB-85-220739. Cincinnati, OH: NIOSH, 1984.

ANTUNES, A. *Prospecção tecnológica em fármacos e medicamentos*, Projeto Inovação em Saúde, Oficina de Fármacos e Medicamentos, 15 de julho de 2004.

ARIE J.P.; MIOT, M.; SASSOON, N.; BETTON, J.M. Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, v. 62, p. 427–437, 2006.

ASHREE. “ANSI/ASHRAE Standar 62: *Gravimetric and dust-spot procedures for testing air cleaning devices used in generate ventilation for removing particulate matter*. ASHRAE. Atlanta, 1989.

ASHRAE: “ANSI/ASHRAE Standard 52.2-2007B: *Method of Testing General Ventilation Air-Cleaning Devices for Removal Efficiency by Particle Size*. ASHRAE, Atlanta, 2008.

AXELSSON, H. *Cell Separation, Centrifugation*. The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. Flickinger MC, Drew SW, Eds. John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, 1999.

BAHRAMI, M.; BAZZAZ, D.H; SAJJADI, S.M. Innovation and improvements in project implementation and management, using FMEA technique. *Procedia. Soc. Behav. Sci.*, v.41, p.418–425, 2012.

BAILEY, S.M; BLUM, P.H.; MEAGHER, M.M. Improved Homogenization of Recombinant Escherichia coli following Pretreatment with Guanidine Hydrochloride. *Biotechnol. Prog.*, v. 11, p. 533-539, 1995.

BAKRI, Y.; MEKAEEL. A.; KOREIH, A. Influence of agitation speeds and aeration rates on the Xylanase activity of *Aspergillus niger* SS7. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, v. 54, Issue 4, p. 659-664, 2011.

BARRERA, D.J; MAYFIELD, S.P. *High-value Recombinant Protein Production in Microalgae*. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology 2nd *ed.* John Wiley & Sons, Ltd. 2013.

BASTOS, A. FMEA *(Failure Mode and Effect Analysis) como ferramenta de prevenção da qualidade em produtos e processos – uma avaliação da aplicação em um processo produtivo de usinagem de engrenagem*. XXVI Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Fortaleza, 2006.

BENDTSEN, B.A. Exhaust gas monitoring of fermentation processes. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, June, p. 84-87, 2000.

BERG J.M.; ANDERSON, R.; ANAYA, M.; LAHLOUH, B.; HOLTZ, M.; DALLAS, T. A two-stage discrete peristaltic micropump. *Sens Actuators A*. v. 104, p. 6-10, 2003.

BEROVIC, M. Upstream Processing - Sterilization in Bioprocess Technology. *Biotechnology*, v. 4, p.80-102, 2009.

BEVERIDGE, T. *Large-Scale Centrifugation*. I. D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke and C. F. Poole, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, London, p. 320-342, 2000.

BHATT, S.S.; MEDHAVI, A.; GUPTA, R.S. Mathematical Analysis on Heat Transfer during Peristaltic Pumping of Fractional Second-Grade Fluid through a Nonuniform Permeable Tube. *Journal of Fluids*, v. 2016, p. 1-8, 2016.

BHATTCHARYA, J. Quality Risk Management –Understanding and Control the Riskin Pharmaceutical Manufacturing Industry. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, v. 4, Issue 1, p. 29-41, 2015.

BIXIO, D.; PARMENTIER, G.; ROUSSEAU, D.; VERDONCK, F.; MEIRLAEN, J.; VANROLLEGHEM, P. A.; THOEYE, C. A quantitative risk analysis tool for design/simulation of wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.,* v. 46, n. 4/5, p. 301–307, 2002.

BONHAM-CARTER, J.; IVES, P.; REEKS, D. Real-Time Off-Gas Analysis Improves Bioreactor Efficiency. *BioProcess International,* September 2004.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. *Instrução normativa nº- 15.* Brasília, DF,2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c83940804745799a86a1d63fbc4c6735/in15_rdc57_2009.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 05 out. 2014.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 17.* Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em: 13 out. 2014.

BROGGI, S. et al. Application of failure mode and effects analysis (FMEA) to pretreatment phases in tomotherapy. *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, v. 14, n. 5, 2013.

BS IEC 61882, *Hazard and operability studies (HAZOP studies)*, Application guide, British Standard, U. K., 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.,* Ribeirão Preto, SP, v. 33, n. 2, Feb.2000.

CAPPIA, J.-M. Principles of Steam-In-Place. *Pharmaceutical Technology*, vol. 28, p. 40, 2004.

CARLSON, C.S. *Understanding and Applying the Fundamentals of FMEAs*. Annual RELIABILITY and MAINTAINABILITY Symposium, IEEE, 2014.

CARPENTER, J.F.; HESTERBERG, L.K.; RANDOLDF, T.W.High-Pressure Disaggregation and Folding of Recombinant Proteins - Examples and Production Cost Comparison. *BioProcess International*, v. 3, n. 5, p. 46, 2005.

CARREÑO, J.M.; GURREA, M.C.; SAMPEDRO, F.; CARBONELL, J.V. Effect of high hydrostatic pressure and high-pressure homogenisation on Lactobacillus plantarum inactivation kinetics and quality parameters of mandarin juice. *European Food Research and Technology*, v. 232, Issue 2, p. 265-274, 2011.

CARRIÓ, M. et al. Amyloid-like Properties of Bacterial Inclusion Bodies. *J. Mol. Biol.*, v. 347, p. 1025–1037, 2005.

CARVALHO, S. M. L.; SILVA, M. G. C. Preliminary risk analysis applied to the handling of health-care waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 4, p. 377 - 381, outubro/dezembro 2002.

CEN: EN-779: 2012 E. *Particulate Air Filters for General Ventilation, Determination of the Filtration Performance*.CEN, Brussels, Belgium, 2012.

CHALONER-LARSSON, G.; ANDERSON, R.; EGAN, A. *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation.*Validation of analytical assays. WHO Geneva, p. 65-95, 1997.

CHANG, K.-H.; CHENG, C.-H. Evaluating the risk of failure using the fuzzy OWA and DEMATEL method. *J. Intell. Manuf.*, v. 22, p.113–129, 2011.

CHEN, Y.; GERBER, J.; HART, G.; CAPONE, J. *Continuous Separation of E. coli Fermentation Broth Using a CEPA LE Laboratory Centrifuge System*. APPLICATION NOTE No. AA319, August, 2013. Disponível em: <https://online-shop.eppendorf.us/US-en/eshopdownload/downloadbykey/70434_186>. Acesso em: 21 mai. 2016.

CHISTI, Y; JAUREGUI-HAZA, U.J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 10, p. 143-153, 2002.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 8, Apr.1986.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design, validation and operation. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 13, p 201-207, 1994.

CHRYSSOLOURIS, G.; PAPAKOSTAS, N.; MAVRIKIOS, D. A Perspective on Manufacturing Strategy: Produce More with Less CIRP. *Journal of Manufacturing Science and Technology*, v. 1, n. 1, p. 45–52, 2008.

CHUNGCHAROEN, T.; NETJAIBUN, K.; PRATABKONG, T.; SUWANNASAM, P.; LIMMUN, W. Effects of inner angle of bowl, flow rate and speed on the efficiency of glycerol separation from the raw biodiesel using cylindrical bowl centrifuge. *Energy Procedia*, v. 138, p. 405-410, p. 2017.

CICEK, K.; TURAN, H.H. Risk-Based Preventive Maintenance Planning using Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) for Marine Engine Systems. *Engineering Systems Management and its Applications*, p. 1-6, 2010.

COLE, B.F.; LEE, M.-L.T.; WITHMORE, G.A.; ZASLAVSKY, A.M. An Empirical Bayes Model for Markov-Dependent Binary Sequences with Randomly Missing Observations. *Journal of the American Statistical Association*, v. 90, n. 432, p.1364-1372, 1995.

COUPER, J.R.; PENNEY, W.R.; FAIR, J.R.; WALAS, S.W. *Chemical Process Equipment: selection and design*, Elsevier Inc., 2nd ed. 2005.

DARBRA, R. M.; DEMICHELA, M.; MURÉ, S. Preliminary risk assessment of ecotoxic substances accidental releases in major risk installations through fuzzy logic. *Process, Safety and Environmental Protection*, v. 86, p. 103-111, 2008.

DAS, A.; KADWEY, P.; MISHRA, J. K.; MOORKOTH, S. Quality Risk Management (QRM) in Pharmaceutical Industry: Tools and Methodology. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, v. 5, n. 3, p. 13-21, 2014.

DAWES, E.A.; RIBBONS, D.W. Studies on the Endogenous Metabolism of Escherichia coli. *Biochem, J.*, v. 95, p. 332, 1964.

DEBAB, A.; CHERGUI, N.; BEKRENTCHIR, K.; BERTRAND J. An Investigation of Heat Transfer in a Mechanically Agitated Vessel. *Journal of Applied Fluid Mechanics*, v. 4, n. 2, Issue 1, p. 43-50, 2011.

DE LA O, H.M.A; LUNA, A.S.; AUGUSTO DA COSTA, A.C.; LEMES, E.M.B. A structural approach to the HAZOP – Hazard and operability technique in the biopharmaceutical industry, *Journal of Loss Prevention in the Process Industries,* v. 35, p. 1-8, 2015.

DHANKHAR, P. Homogenization Fundamentals. *IOSR Journal of Engineering*, v. 4, Issue 5, p. 1-8, 2014.

DIETZ, S. High impact, low probability? An empirical analysis of risk in the economics of climate change. *Climatic Change*, v. 103, n. 3, p. 519-541, 2011.

DINGERMANN, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. Biotechnology Journal, v. 3, p. 90-97, 2008.

DION, M.; PARKER, W. Steam Sterilization Principles. *Pharmaceutical Engineering*, v. 33, n. 6, p. 1-8, 2013.

DORAN, P. M. *Bioprocess engineering principles* (Second Edition), Academic Press Waltham, MA, 2012.

DROÎYNER, P.; VEITH, E. Risk Based Inspection Methodology Overview; *Diagnostyka,* v. 27, p. 82-88, 2002.

DU, M.; YE, X.; WU, K.; ZHOU, Z. A Peristaltic Micro Pump Driven by a Rotating Motor with Magnetically Attracted Steel Balls. *Sensors*, v. 9, p. 2611-2620, 2009.

DUBBELBOER, A. et al. Population balances combined with Computational Fluid Dynamics: A modeling approach for dispersive mixing in a high-pressure homogenizer. *Chem. Eng. Sci.*, v. 117, p. 376–388, 2014.

DUMBRAVĂ, V. Using Probability – Impact Matrix in Analysis and Risk Assessment Projects. *Journal of Knowledge Management, Economics and Information Technology*, p. 76-96, 2013.

DUNJÓ, J., *New Trends For Conducting Hazard & Operability (HAZOP) Studies In Continuous Chemical Processes*. Universitat Politècnica de Catalunya – UPC, Spain, 2010.

DUNJÓ, J.; FTHENAKISB, V. M.; DARBRAA, R. M.; VÍLCHEZA, J. A.; ARNALDOSA, J. Conducting HAZOPs in continuous chemical processes: Part I. Criteria, tools and guidelines for selecting nodes. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 89, p. 214–223, 2011.

DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAM, J.; PŘENOSIL, J. E. *Bioreactor Modelling, in Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples* (Second Edition), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2003.

EKPENI, L. E. N.; BENYOUNIS, K. Y.; NKEM-EKPENI, F. F.; STOKES, J.; OLABI, A. G. Underlying factors to consider in improving energy yield from biomass source through yeast use on high-pressure homogenizer (hph). *Energy*, v. 81, p. 74-83, 2015.

ELABASSI, N.; BERGSTROM, J.; BROWN, S. Fluid-Structure Interaction Analysis of a Peristaltic Pump. *COMSOL Proceedings Conference*, Boston, 2011.

ESA, F.; RAHMAN, N.A.; KALIL, M.S.; TASIRIN, S.M. Effects of Agitation Conditions on Bacterial Cellulose Production by Acetobacter Xylinum 0416 in Fermentation ofMatured Coconut Water Medium. *Malaysian Journal Of Analytical Sciences*, v. 21, n. 1, p. 261-266, 2017.

FERNANDES, J.; REBELATO, M. Proposta de um método para integração entre QFD e FMEA. *Gestão & Produção*; v. 13, n. 2, p. 245-259, 2006.

FITCH, J. A New Look at Criticality Analysis for Machinery Lubrication. *Machinery Lubrication*, April 2013.

FLYVBJERG, B. Five Misunderstandings about Case-Study Research. *Qualitative Inquiry*, v. 12, n. 2, pp. 219-245, April 2006.

FRAGASSA, C.; IPPOLITI, M. Failure Mode Effects and Criticality Analysis (FMECA) As A Quality Tool To Plan Improvements in Ultrasonic Mould Cleaning Systems. *International Journal for Quality Research,* v. 10, n. 4, p. 847-870, 2016.

FREEMAN, D. The Shaker in Bioengineering. *Methods in Microbiology*, v. 2, p. 175-185, 1970.

GALL, V.; RUNDE, M., SCHUCHMANN, H.P. Extending Applications of High-Pressure Homogenization by Using Simultaneous Emulsification and Mixing (SEM)—An Overview. *Processes*, v. 4, n. 46, p. 1-15, 2016.

GARCÍA, A. O. F.; VALLEJO, D. B. M.; MORA, H. C. E. La calidad desde el diseño: principios y oportunidades para la industria farmacéutica. *Estudios Gerenciales*, v. 31, p. 68–78, 2015.

GARCIA, P.A.A. Uma abordagem via análise envoltória de dados para o estabelecimento de melhorias em segurança baseadas na FMEA. *Gest. Prod., São Carlos*, v. 20, n. 1, p. 87-97, 2013.

GARCIA-FRUITOS, E.; VAZQUEZ, E.; DIEZ-GIL, C.; CORCHERO, J. L.; SERAS-FRANZOSO, J. Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. Trends Biotechnology, v. 30, p. 65–70, 2012.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 153-176, 2009.

GARCÍA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V.E., MERCHUK, J.C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 289-307, 2010.

GARFIN, G.; LEROY, S.; MCMAHAN, B.; BLACK, M.; ROH, B. Preparing for High Consequence, Low Probability Events: Heat, Water & Energy in the Southwest. *Report to the U.S. Bureau of Reclamation from the project Enhancing Water Supply Reliability* - Arizona, September 2015.

GARAFOLA, W.M. Tips on Integrity Testing Multiple Filters: Guidelines on Reducing the Time Needed to Accurately Conduct a Bubble Point Test. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, v. 31, n.11, p. 38-38, 2011.

GAYARD, Y. L. M. Gerenciamento de risco para autoclaves. *Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*, p. 24-39, Janeiro/Fevereiro, 2009.

GEA NIRO SOAVI – SOLERI DO BRASIL, FDS, P&ID, Planta de Lise e Centrifugação. Documentação Técnica, 2013

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry- a review. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 541–553, 2002.

GHARE, M. Peristaltic pump: Basics and applications. Disponível em: <http://www.buzzle.com/articles/peristaltic-pump-basics-andapplications.html>. Acesso em: 17 dez. 2016.

GIBBARD, I. Improving Plant Operations with Heat Transfer Enhancement. *Petroleum Technology Quarterly*, v. 2, n. 3, p. 81-87, 1997.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by Aureobasidium pullulans in batch culture?.*Appl Microbiol Biotechnol*, v. 46, p. 503-510, 1996.

GILARDI, C.; GOTTI, M. Semi-Quantitative HAZOP Methodology Applied to Upstream Oil & Gas Activities. *Chem. Eng. Trans. Ital. Assoc. Chem. Eng*, v. 31, p. 232-233, 2013.

GILL, N.K.; APPLETON, M.; BAGANZ, F.; LYE, G.J. Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 164-176, 2008.

GOBLE, W.M.; CHEDDIE, H. Safety Instrumented Systems Verification: Practical Probabilistic Calculations. *The Instrumentation, Systems,and Automation Society*, p.61-78, p. 83-86, 2005.

GONTHIER, A.; GUEÂRIN-FAUBLEÂE, V.; TILLY, B.; DELIGNETTE-MULLER, M.-L. Optimal growth temperature of O157 and non-O157 Escherichia coli strains. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 352-356, 2001.

GOSCH, T.; APPRICH, S.; KNEIFEL, W.; NOVALIN, S. A combination of microfiltration and high pressure treatment for the elimination of bacteria in bovine colostrum. *International Dairy Journal*, v. 34, p. 41-46, 2014.

GOUVEIA, B.G.; RIJO, P.; GONÇALO, T.S.; REIS, C.P. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *J Pharm Bioallied Sci.*, v. 7, n. 2, p. 87-96, 2015.

GREINER, J. HEPA Filter Leak Testing Using the Particle Counter Scan Method. *CleanRooms*, v. 4, Issue 9, p.36–39, 1990.

GROEP, M. E.; GREGORY, M. E.; KERSHENBAUM, L. S.; BOGLE, I. D. Performance modeling and simulation of biochemical process sequences with interacting unit operations. *Biotechnology Bioeng*, v. 67, Issue 3, p. 300-11, 2000.

GULLEY, D. Troubleshooting Shell-and-Tube Heat Exchangers. *Hydrocarbon Processing*, v. 75, n.9, p. 91-98, 1996.

GUPTA, P. R.; SHENDE, M. A.; SHAIKH, D. M. Ordinal Logistic Regression Model of Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) in Direct Compressible Buccal Tablet. *International Journal of Pharma Research & Review*, v. 2, Issue 6, p. 9-17, June 2013.

GUTACKER, A. R. Ambient Air Filtration. *Contamination Control Technologist Handbook*, ed. A. Gutacker, Chapter 28. Webster, NY: ARGOT, Inc. 1991.

HACKER, D. L.; DE JESUS, M.; WURM, F. M. *25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells — Where do we go from here?*. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 6, p. 1023-1027, 2009.

HAKALEHTO, E. Gas Detection as a Means to Control Microbial Metabolism in Biorefineries and Reduction of Environmental Emissions. *Journal of Environmental Indicators,* v. 9, p. 14-16, 2015.

HAMAMOTO, K.; ISHIMARU, K.; TOKASHIKI, M. Perfusion Culture of Hybridoma Cells Using a Centrifuge to Separate Cells from Culture Mixture. *Cytotechnol*, v. 3, p. 329, 1990.

HARMSEN, J. *Chapter 4 - Development Stage*, Industrial Process Scale-up, Elsevier, Amsterdam, 2013.

HAIMES, Y. Y. *Risk modelling, assessment, and management* (3rd ed.). A John Wiley & Sons Inc. Publication, ISBN 978-0-470-28237-3, 2009.

HARMSEN, J. *Chapter 4 - Development Stage*, Industrial Process Scale-up, Elsevier, Amsterdam, 2013.

HARRISON, D.E.F; PIRT, S.J. The Influence of Dissolved Oxygen Concentration on the Respiration and Glucose Metabolism of Klebsiella aerogenes during Growth. *J. gen. Microbiol.*, v. 46, p. 193-211, 1967.

HARRISON, S. Bacterial Cell Disruption: A Key Unit Operation inthe Recovery of Intracellular Products. *Biotech. Adv.*, v. 9, p. 217-240, 1991.

HARRISON, S.T.L. Cell disruption. *Comprehensive Biotechnology* 2nd ed. Oxford: Elsevier, v 2, p. 619–639, 2011.

HEWITT, C. J.; BOON, L. A.; McFARLANE, C. M.; NIENOW, A. W. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on Escherichia coli W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. Biotechnology. Bioengineering, v. 59, p. 612-620, 1998.

HIROKI, K. Strategies for managing low-probability, high-impact events. *Knowledge notes, cluster 6. Washington: World Bank,* 2012. Disponível em: http://wbi.worldbank.org/wbi/document/strategies-managing-low-probability-high-impact-events. Acesso em; 01 dez. 2016.

HOLDRICH, R. *Fundamentals of particle technology*. Loughborough, Midland Information Technology and Publishing, 2002.

HWANG, P. M.; PAN, J. S.; SYKES, B. D. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. *FEBS Letters*, v. 588, p. 247–252, 2014.

IACOB, V.-S. Risk Management And Evaluation And Qualitative Method Within The Projects. *Ecoforum*, v. 3, Issue 1, n. 4, 2014.

INCROPERA F.P. *Introduction to Heat Transfer*, 5th edition, Wiley, 2007.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONIZATION - ICH. *HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE QUALITY RISK MANAGEMENT - Q9* Current Step. 4 version. 9 November 2005.

INTERNATIONAL FEDERATION PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS & ASSOCIATIONS – IFPMA. A indústria farmacêutica e a saúde global: fatos e números. 2011.
Disponível em:
<http://www.ifpma.org/fileadmin/content/Publication/2011/IFPMA_A_Industria_Farmaceutica_e_a_Saude_Global_2011.pdf>. Acesso em: 16 set. 2014.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 8402:1994. Gestión de la Calidad y aseguramiento de la calidad. Disponível em: < https://www.iso.org/standard/20115.html>. Acesso em: 15 sep. 2016.

ISO/TC 176/SC2. “Risk” in ISO 9001:2015. Document N1222. 2014. Disponível em <https://www.standard.no/Global/PDF/Kvalitet/ISO-TC176-SC2_N1222_N1222_-_Risk_in_ISO_9001_2014- 07.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2015.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 31000:2009. 2015b. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm ?csnumber=43170>. Acesso em: 20 mai. 2017.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 31010:2009. Risk Assesment Techniques. Disponível em: < https://www.iso.org/standard/51073.html> .Acesso em 23 mai. 2017.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR PHARMACEUTICAL ENGINEERING - ISPE. A White Paper on Risk-Based Qualification for the 21st Century. ISPE Rev. 2. March 2005.

JAGANI, H.; HEBBAR, K.; GANG, S.S.; RAJ, P.V.; CHANDRASHEKHAR, H.R.; RAO, J.V. An Overview of Fermenter and the Design Considerations to Enhance Its Productivity. *Pharmacologyonline*, v. 1, p. 261-301, 2010.

JAGTAG, M. Hazard and operability (HAZOP) analysis: A review of basics. *Clinition’s Science Journal*, v. 1, n. 1, p.1-15, 2017.

JALALIRAD, R. Production of antibody fragment (Fab) throughout Escherichia coli fed-batch fermentation process: changes in titre, location and form of product. Electron. J. Biotechnol. 16, 2013.

JAROSZCZYK, T.; FALLON, S.L.; SCHUARTZ, S.W. Development of High Dust Capacity, High Efficiency Engine Air Filter with Nanofibers. *Journal of KONES Powertrain and Transport,* v. 15, n. 3, 2008.

JAWAB, F.; ARIF, J. Risk Matrix Model Applied to the Outsourcing of Logistics’ Activities. *Journal of Industrial Engineering and Management,* v. 8, n. 4, p. 1179-1194, 2015.

JIA, B.; JEON, C.O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. *Open Biology*1, 60196, v. 6, n. 8, p. 1-17, 2016.

JIANG, W.; XIE, C.; WEI, B.; ZHOU, D. A modified method for risk evaluation in failure modes and effects analysis of aircraft turbine rotor blades. *Advances in Mechanical Engineering*, v. 8, n. 4, p.1–16, 2016.

JIMENEZ-GONZALEZ, C.; PONDER, C. S.; BROXTERMAN, Q. B.; MANLEY, J. B. Using the Right Green Yardstick: Why Process Mass Intensity Is Used in the Pharmaceutical Industry To Drive More Sustainable Processes. Organic Process Research & Development, v. 15, Issue 4, p. 912-917, 2011.

JOHNSON, K.; KHAN, M. A study into the use of the process failure mode and effects analysis (PFMEA) in the automotive industry in the UK. *Journal of Materials Processing Technology*; v. 139, n. 1-3, p. 348 – 356, 2000.

JØRGENSEN, F.; LAMBERT, P. Accurate Biopharmaceutical Dispensing: Peristaltic or Piston Pumps. *Innovations in Pharmaceutical Technology,* v. 26, p.78-80, 2008.

KAPOOR, J.C.; GUPTA, M. Elements of Clean-room Technology and Contamination Control. *Defence Science Journal,* v. 53, n. 3, p. 249-258, 2003.

KARIMI, A.; GOLBABAEI, F.; MEHRNIA, M.R.; NEGHAB, M.; MOHAMMAD, K.; NIKPEY, A.; POURMAND, M.R. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactorusing different impeller configurations for environmental purposes. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering,* v. 10, n. 6, 2013.

KARIMI, A.; ZARAFSHAN, F.; JANTAN, A.; RAMLI, A.R.; SARIPAN M.L. Accurate and Efficient Reliability Markov Model Analysis of Predictive Hybrid M-out-N Systems. *Proc. IEEE Symp. Computer Science and Information Technology (ICCSIT 10),* IEEE Press, July, pp. 130-134, 2010.

KARMACHARYA, J. B. Good Manufacturing Practices(GMP) for Medicinal Products, *Promising Pharmaceuticals*, Dr. Purusotam Basnet (Ed.), 2009. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/promising-pharmaceuticals/good-manufacturing-practices-gmp-formedicinal-products>, Acesso em: 10 jun. 2016.

KĘSIK, M.; SĄCZYŃSKA, V.; SZEWCZYK, B.; PŁUCIENNICZAK, A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. *Immunology Letters*, v. 91, p. 197–204, 2004.

KHAN, F. I.; ABBASI S. A. Techniques and methodologies for risk analysis in chemical process industries. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 11, p. 261–277, 1998.

KINZEL, K. Narrative and evidence. How can case studies from the history of science support claims in the philosophy of science?.*Studies in History and Philosophy of Science*, v. 49, p. 48-57, 2015.

KIRCHNER, K.; WAGNER, S.; REHM, H.-J. Removal of organic air pollutants from exhaust gases in the trickle-bed bioreactor. Effect of oxygen. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.45, p. 415-419, 1996.

KIRK, T.V.; SZITA, N. Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems. *Biotechnol Bioeng.*, v. 110, p. 1005-1019, 2013.

KNUSTON, B.; HUETTEL, S.A. The risk matrix. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, v. 5, p. 141-146, 2015.

KOHLER, L.E.; SILVERSTEIN, J.; RAJAGOPALAN, B. Risk-Cost Estimation of On-Site Wastewater Treatment System Failures Using Extreme Value Analysis. *Water Environment Research*, v. 89, n. 5, p. 406-415, 2017.

KONSTANTOPOULOS, T. Introductory lecture notes on Markov Chains and Random Walks, 2009. Disponível em: <http://www2.math.uu.se/~takis/L/McRw/mcrw.pdf>, Acesso em: 10 mai. 2016.

KOUDA, T; NARITOMI, T.; YANO, H.; YOSHINAGA F. Effects of Oxygen and Carbon Dioxide Pressures on Bacterial Cellulose Production by Acetobacter in Aerated and Agitated Culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84(2), p. 124-127, 1997.

LANDER, R.; DANIELS, C.; MEACLE, F. Efficient, Scalable Clarification of Diverse Bioprocess Streams. Bioprocess International, November 2015.

LARA, A.R. Utility of an Escherichia coli strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. Biotechnol. Bioeng., v. 99, p. 893-901, 2008.

Le SAUX, D. The Effective Use of Process Control Plans and Process Failure Mode Effects Analysis in a GaAs Semiconductor Manufacturing Environment. *CS MANTECH Conference*, Vancouver, British Columbia, Canada, April 24-27, 2006.

LEE, B.; PRESTON, F.; GREEN, G. Preparing for High-impact, Low-probability Events*, The Royal Institute of International Affairs*, Lessons from Eyjafjallajökull, London, 2012.

LEE, M.-L. T. A Two-State Markov Model. *Communications in Statistics, Part A—Theory and Methods*, v. 23, p. 615-623, 1993.

LEE, Y.J.; JEONG, K.J. Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast. J Biosci Bioeng. 2015.

LEIGHTON, T.; RUBINFELD, R. Conditional Probability. *Mathematics for Computer Science Lecture Notes*, November, 2009. Disponível em: <http://web.mit.edu/neboat/Public/6.042/conditionalprobability.pdf>, Acesso em: 5 abr. 2015.

LENCASTRE, F. R. et al. Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 575–599, 2011.

LEUNG W., *Centrifugal Separations in Biotechnology*. Academic Press, New York, NY. 2007.

LETKI, A.; MOLL, R.; SHAPIRO, L. Centrifugal separation. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th edn, Vol. 21. New York: John Wiley, 1997.

LIPOL, L.S.; HAQ, J. Risk Analysis Method: FMEA/FMECA in the Organizations. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, v. 11, n. 5, p. 49-57, 2011.

LIU, H.; DENG, X.; JIANG, W. Risk Evaluation in Failure Mode and Effects Analysis Using Fuzzy Measure and Fuzzy Integral. *Symmetry*, v. 9, n. 162, p. 1-13, 2017.

LOTLIKAR, M. V. Quality Risk Management (QRM): A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, v. 3, Issue 2, p. 149-154, 2013.

LOUDIN, T. The Evolution of Peristaltic Pumps. *Pump Engineer*, p. 44-47, September, 2007.

LOYD V. A, JR., POPOVICH N. G., ANSEL H. C., *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, 9 th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

LYON, B.K.; HOLLCROFT, B. Risk Assessments - Top 10 Pitfalls & Tips for Improvement. *Professional Safety*, v. 57, n. 12, p. 28-34, 2012.

MAITI. S. M. J. Risk analysis using FMEA: Fuzzy similarity value and possibility theory based approach. *Expert Systems with Applications*, v. 41, p. 3527–3537, 2014.

MAJEKODUNMI, S.O. A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. *American Journal of Biomedical Engineering*, v. 5, n. 2, p. 67-78, 2015.

MANGER, R.P.; PAXTON, A.B.; PAWLICKI, T.; KIM, G.-Y. Failure mode and effects analysis and fault tree analysis of surface image guided cranial radiosurgery. *The International Journal of Medical Physics Research and Practice*, v. 42, Issue 5, p. 2449-2461, 2015.

MARANHAS M. C. S. M. I., Qualificação de Equipamentos na Indústria Farmacêutica Aplicando Análise de Risco: Qualificação de Equipamento de Lavagem de Frascos para Processamento Asséptico e de Equipamento de Lavagem de Material de Laboratório, Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Departamento de Engenharia Química e Biológica (DEQB), UTL. Instituto Superior Técnico, Lisboa Portugal, 2008.

MARHAVILAS, P. K.; KOULOURIOTIS, D. E. A risk estimation methodological framework using quantitative assessment techniques and real accidents' data: application in an aluminum extrusion industry. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 21, Issue 6, p. 596-603, 2008.

MARHAVILAS, P. K.; KOULOURIOTIS, D. E. Developing a new alternative risk assessment framework in the work sites by including a stochastic and a deterministic process: a case study for the Greek Public Electric Power Provider. *Safety Science*, v. 50, Issue 3, p. 448-462, 2011.

MARKOWSKI, A.S.; MANNAN, M.S. Fuzzy risk matrix. *Journal of Hazardous Materials*, v. 159, Issue 1, p. 152-157, 2008.

MASSINGHAM, P. Knowledge risk management: a framework. *Journal Of Knowledge Management*, v. 14, n. 3, p. 464-485, 2010.

MAYBURY, J.P.; HOARE, M.; DUNNILL, P. The Use of Laboratory Centrifugation Studies to Predict the Performance of Industrial Machines: Studies of Shear Insensitive and Shear Sensitive Materials. *Biotechnol. Bioeng*. V. 67, p. 265, 2000.

McCABE, W. L.; SMITH J. C. HARRIOTT P., *Unit Operations of Chemical Engineering*, McGraw-Hill 7th ed., New York – USA, 2005.

McDANIEL, L.E.; BAILEY, E.G.; ZIMMERLI, A. Effect of Oxygen Supply Rates on Growth of Escherichia coli. *Applied Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 109-114, 1965.

McNEIL, B.; HARVEY L. M. *Practical Fermentation Technology*. Chichester, England: Wiley, 2008.

MELTZER, T.H.; JORNITZ, M.W. Principles and considerations for bubble point and diffusive airflow integrity testing methods for sterilizing-grade filters. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences,* v. 13, n. 4, p.99-101, 2008.

MERZ, B.; ELMER, F.; THIEKEN, H. Significance of “high probability/low damage” versus “low probability/high damage” flood events. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.,* v. 9, p. 1033–1046, 2009.

MIDDELBERG, A. P. J. *Microbial cell disruption by high-pressure homogenization. In: Downstream processing of proteins: methods and protocols*. Desai M. A. (ed*)* Springer, New York, p. 11–21, 2000.

MILA, L.; VALDES, R.; TAMAYO, A.; PADILLA, S.; FERRO, W. Application of a risk analysis method to different technologies for producing a monoclonal antibody employed in hepatitis B vaccine manufacturing. *Biologicals*, v. 40, Issue 2, p. 118–128, 2012.

Ministério da Saúde – Singapura, *Guideline on Laboratory/Work Activity Risk Assessment*, 2016. Disponível em: <https://www.moh.gov.sg/content/dam/moh_web/BioSafety/docs/Guideline%20on%20Laboratory%20Activity%20Risk%20Assessment%20FINALJul11.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2017.

MOATARI-KAZEROUNI, A. CHINNIAH, Y.; AGARD, B. A proposed occupational health and safety risk estimation tool for manufacturing systems. *International Journal of Production Research*, v.53, n. 15, p. 4459-4475, 2015.

MOHAMMADFAM, I.; SAJEDI, A.; MAHMOUDI, S.; MOHAMMADFAM, F. Application of Hazard and Operability Study (HAZOP) in Evaluation of Health, Safety and Environmental (HSE) Hazards. *International Journal of Occupational Hygiene*, v. 4, Issue 2, p. 69-72, 2012.

MOHR, K.-H. High-pressure Homogenization. Part I. Liquid-Liquid Dispersion in Turbulence Fields of High Energy Density. *Journal of Food Engineering*, v. 6, p. 177-186, 1987.

MOLLAH, H. Application of Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) for Process Risk Assessment. *BioProcess International*, November 2005.

MORGAN, M.G., et al. Categorizing risk for risk ranking. *Risk analysis*, v. 20, n. 1, p. 49-58, 2000.

MOSCATO, F. ET AL. Pressure pulsation in roller pumps: A validated lumped parameter model. *Medical Engineering and Physics,* v. 30, p.1149–1158, 2008.

MOUTAFCHIEVA, D.; POPOVA, D.; DIMITROVA, M.; TSCHAOUSHEV, S. Experimental Determination Of The Volumetric Mass Transfer Coefficient. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy,* v. 48, n. 4, p. 351-356.

MUKHERJEE, R. Effectively Design Shell-and-Tube Heat Exchangers. *Chemical Engineering Progress,* February, 1998.

MURRAY, S.L.; GRANTHAM, K.; DAMLE, S.B. Development of a Generic Risk Matrix to Manage Project Risks. *Journal of Industrial and Systems Engineering*, v. 5, n. 1, p.35-51, 2011

NAFA National Air Filtration Association, Guide to Air Filtration, 5th Ed., Madison, WI, 2014

NAIK, S. U., *Risk Management in Pharma using FMEA*. Disponível em: <https://es.slideshare.net/sandeepleansixsigma/risk-management-using-fmea-in-pharma> Acesso em: 11 out.2016.

NAKIMBUGWE, D.; MASSCHALCK, B.; ANIM, G.; MICHIELS, C. W. Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 19–25, 2006.

NASSERI, A. T.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Single Cell Protein: Production and Process. American Journal of Food Technology, v. 6, Issue 2, p. 103-116, 2011.

NAUMAN, B., *Handbook of Chemical Reactor Design, Optimization and Scale-up*; McGraw-Hill: New York, 2008.

NEDELJAKOVÁ I., Review of Risk Assessment Methods; *Journal of Information, Control and Management Systems,* v. 5, Issue 2, 2007.

NEKRASOV, S.G. To the Projection of a Peristaltic Slit Pump. *Procedia Engineer.,* v. 150, p. 506-513, 2016.

NGUYEN, M.T. The effect of temperature on the growth of the bacteria Escherichia coli DH5α. *Saint Martin's University Biology Journal*, v. 1, 2006.

NIEL-LAINÉ, J.; MARTELLI, N.; BONAN, B.; TALON, D.; DESROCHES, A.; PROGNON, P.; FLORENCE VINCENT, F. Interest of the preliminary risk analysis

method in a central sterile supply department. BMJ quality & safety, v. 20, p. 698 – 703, 2011.

NOHARA, J. J.; ACEVEDO, C. R. & VILA, A. R. *Aplicação da Gestão do Conhecimento em Processos de Gerenciamento de Risco*. In: Anais XXV Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2002, Curitiba. ENEGEP, 2005.

NORRIS, J. R. *Markov Chains*. Cambridge Series in Statistical and Probabilistic Mathematics, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

ORTEGA-RIVAS, E.; PEREZ-VEGA, S.B. Solid-liquid separations in the food industry: operating aspects and relevant applications. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 50, n. 2, p. 86-105, 2011.

OTHMAN, N.; LERK, L.L.; CHELLIAPAN, S.; MOHAMMAD, R.; ARIFF, N.M. Risk Assessment and Control Measures forThe Printing Ink Production Process. *International Journal of Civil Engineering and Technology (IJCIET),* v. 8, Issue 10, p. 41-55, 2017.

OZILGEN, S. Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) for confectionery manufacturing in developing countries: Turkish delight production as a case study. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 32, n.3 p. 1-10, 2012.

PAGAR, G.J.; VARADE, B.V. An Overview of Vibrational Analysis of Peristaltic Pump. *International Journal of Recent Trends in Engineering & Research (IJRTER)*, v. 2, Issue 12, p. 211-214, 2016.

PALOMARES, L. A.; KURI-BREÑA, F.; RAMÍREZ, O. T. Industrial recombinant protein production. *The Encyclopedia of Life Support Systems*. EOLSS Publishers, Oxford. 6.58.3.8., 2002.

PALOMARES, L.A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMIREZ, O.T. Production of Recombinant Proteins, Challenges and Solutions. *Methods in Molecular Biology*, ch.2, p. 15-52, 2004.

PAN, H.; BUENCONSEJO, M.; REINEKE, K.F.; SHIEH, Y.C. Effect of Process Temperature on Virus Inactivation during High Hydrostatic Pressure Processing of Contaminated Fruit Puree and Juice. *Journal of Food Protection*: v. 79, n. 9, p. 1517-1526, 2016.

PANDEY, A.; SINGN M.; SONAWANE, A.U.; RAWAT, P.S. FMEA Based Risk Assessment of Component Failure Modes in Industrial Radiography. *International Journal of Engineering Trends and Technology (IJETT),* v. 39, n. 4, p. 216-225, 2016.

PANGARKAR, V. G., *Venturi Loop Reactor, in Design of Multiphase Reactors*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2014.

PAQUES, J-J.; GAUTHIER, F. Analysis and classification of the tools for assessing the risks associated with industrial machines. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*, v. 13, Issue 2, p. 173–87. 2007.

PAWAR, S. Progressive Worst Case Scenario Analysis: Improving Functional Safety by Bridging Gaps in FMEA for Effective Implementation of ISO 26262. *SAE Technical Paper* 2016-01-8132, 2016.

PEACE, C. The risk matrix: uncertain results?,*Policy and Practice in Health and Safety*, v. 15, n. 2, p. 131-144, 2017.

PÉREZ-MARÍN, M.; RODRÍGUEZ-TORAL, M. A. HAZOP e Local approach in the Mexican oil & gas industry. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 26, p. 936-940, 2013.

PETERNEL, S.; KOMEL, R. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microb Cell Fact*, v. 9, n. 66, 2010.

PETERNEL, S.; KOMEL, R. Active protein aggregates produced in Escherichia coli. *Int J Mol Sci*. v. 12, p. 8275–8287, 2011.

PETROVIĆ, D. V.; TANASIJEVIĆ, M.; MILIĆ, V.; LILIĆ, N.; STOJADINOVIĆ, S.; SVRKOTA, I. Risk assessment model of mining equipment failure based on fuzzy logic, *Expert Systems with Applications*, v. 41, Issue 18, p. 8157-8164, 2014.

PETROVSKIY, E.A. et al. The FMEA-Risk Analysis of Oil and Gas Process Facilities with Hazard Assessment Based on Fuzzy Logic, *Modern Applied Science*; v. 9, n. 5, 2015.

PICKARD, K.; MULLER, P.; BERTSCHE, B. Multiple Failure Mode and Effect Analysis-An Approach to Risk Assessment of Multiple Failure with FMEA. *Proc. IEEE Symp. Reliability and Maintainability Symposium(RAMS 05)*, IEEE Press, p.457-462, 2005.
POULIOT, Y.; CONWAY, V.; LECLERC, P.-L. Separation and Concentration Technologies in Food Processing. *Food Processing: Principles and Applications*, Second Edition, John Wiley & Sons, 2014.

POULOSE, S. M.; MADHU, G. Hazop Study for Process Plants: A Generalized Approach. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, v. 2, Issue 7, July 2012.

PRIMO, J. Shell and Tube Heat Exchangers Basic Calculations. *PDH Online*, Disponível em: <http://www.pdhcenter.com/courses/m371/m371content.pdf>.Acesso em: 02-fev-2017.

PROAG S.L, PROAG, V, *A framework for risk assessment*, 4th International Conference on Building Resilience, Building Resilience , Salford Quays, United kingdom 8-10 September 2014.

PURDY, G. ISO 31000 2009: *Setting a New Standard for Risk Management*. Risk Analysis. Vol. 30, n. 6, p. 881- 886, 2010.

PUNZ, S.; FOLLMER, M.; HEHENBERBER, P.; ZEMAN, K. IFMEA – Integration Failure Mode And Effects Analysis. *International Conference on Engineering Design, Iced11*, Technical University of Denmark, August, 2011.

RACHID, H.; OUAZZANI, M.T. The Effect of a Pulsatile Flow on the Peristaltic Output: Case of a Newtonian Fluid. *Adv. Studies Theor. Phys*, v. 2, n. 6, p. 291-307, 2008.

RADHAKRISHNAMACHARYA, G.; MURTY, V.R. Heat Transfer to Peristaltic Transport in a Non-Uniform Channel. *Defence Science Journal*, v. 43, n. 3, p. 275-280, 1993.

RAH, J.-E.; MANGER, R.P.; YOCK, A.D.; KIM, G.-Y. A comparison of two prospective risk analysis methods: Traditional FMEA and a modified healthcare FMEA. *The International Journal of Medical Physics Research and Practice,* v. 43, Issue 12, p. 6337-6353, 2016.

RAMASUBRAMANIYAN, P.; PALANICHAMY, S.; SRINAG, T.; SHARANYA, N.; LAKSHMI, M.; SOLAIRAJ, P. Equipment qualification on blister packing machine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, v. 2, Issue 6, p 4698-4718, 2013.

RASPOTNIG, C.; OPDAHL, A. Comparing risk identification techniques for safety and security requirements. *Journal of Systems and Software*, v. 86 n. 4, p. 1124-1151, April 2013.

RIDEAL, G. The Filtration Society: The importance of testing and standards. *Filtration & Separation*, v. 46, n.1, p.28-30, 2009.

RIOS, M. Disposable Filtration Lightens Cleaning and Validation Load. *Pharmaceutical Technology,* p. 46-56, September 2003.

RISTIC, D. A Tool for Risk Assessment. *Safety Engineering*, v. 3 n. 3, p.121-127, 2013.

RODRIGUES-DA-SILVA, L. H.; CRISPIM, J. A. The project risk management process, a preliminary study. *Procedia Technology*, v. 16, p. 943 – 949, 2014.

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

ROHSENOW, W.M.; WEBBER, J.H.; LING, A.T. Effect of Vapor Velocity on Laminar and Turbulent Film Condensation, *Trans. ASME*, v. 78, p. 1637- 1643, 1973.

ROSSING, N. L.; LIND, M.; JENSEN, N.; JØRGENSEN, S. B. A Goal Based Methodology for HAZOP Analysis. *International Journal of Nuclear Safety and Simulation*, v. 1, Issue 2, p. 134-142, 2011.

ROWLEY, J., Using Case Studies in Research. *Management Research News*, v. 25, n. 1, p. 16 – 27, 2002.

ROWLEY, J.A. Developing Cell Therapy Biomanufacturing Processes. *Chemical Engineering Progress*, SBE Stem Cell Engineering Nov Supplement, p. 50-55, 2010.

RUGE, D. Risk Matrix as Tool for Risk Assessment in the Chemical Process Industries. *Probabilistic Safety Assessment and Management*, ESREL, p. 2693-2698, 2004.

SAMARAJ S.; THIYAGARAJAN, P.M.P. A Perspective of Risk Assessment for Product Developments in Biotechnology and Pharmaceutical Products, *International Journal Of Management (IJM)*, v. 5, Issue7, p. 44-50, 2014.

SARTORIUS STEDIM. *Arrangement Plan Fermentation3d layout*, Alemanha, 2009.

SAWANT, A.; DIETERICH, S.; SVATOS, M.; KEALL, P. Failure mode and effect analysis-based quality assurance for dynamic MLC tracking systems. *Med. Phys.*, v. 37, p. 6466–6479, 2010.

SCHUMACKER, R.; TOMEK, S. Understanding Statistics Using R. Chapter 2 – Probability, *Springer Science+Business Media*, New York, 2013.

SEAWRIGHT, J.; GERRING, J., Case Selection Techniques in Case Study Research. *Political Research Quarterly*, v. 61, n. 2 p. 294-308, June 2008.

SEGISMUNDO, A.; MIGUEL, P. Failure mode and effects analysis (FMEA) in the context of risk management in new product development. *International Journal of Quality & Reliability Management*; v. 25, n. 9, p. 899 – 912, 2008.

SEMENOV, A. V.; VAN BRUGGEN, A.H.C.; VAN OVERBEEK, L.; TERMORSHIZEN, A.J.; SEMENOV, A. M. Infuence of temperature fuctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in cow manure. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 60, p. 419-428, 2007.

SENORALE-POSE, R.A.M, MARIN, M. Inclusion bodies: not that bad…. *Front.Microbiol.,*v. 5, p. 56, 2000.

SHA, F.; HANGJUN, Z.; YEZHI, X. The Application of a Risk Matrix Method on Campus Network System Risk Assessment. *International Conference on Communication Software and Networks - ICCSN*, IEEE, p. 474-478, 2011.

SHIEH, J.; HUBER, J.E.; FLECK, N.A.; ASHBY, M.F. The selection of sensors. *Prog. Mater. Sci.*, v. 46, p. 461-504, 2001.

SHINZATO, M. P.; HESS, S. C.; BONCZ, M. A.; MACENTE, D. F. C.; SKOWRONSKI, J. Análise preliminar de riscos sobre o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde de uma instituição de ensino em Mato Grosso do Sul: estudo de caso. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, São Paulo, v. 35, n. 122, p. 340 - 352, 2010.

SHÜLLER, J. C. H.; BRINKMAN, J. L.; Van GESTEL, P. J.; Van OTTERLOO, R. W. *Methods for Determining and Processing Probabilities: Red Book.* Committee for the Prevention of Disasters, 2nd ed., the Netherlands, 1997.

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; UPADHYAY, A.K.; SINGH, S.M.; PANDA, A.K. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, v. 14, n. 41, p.1-10, 2015.

SITUMBEKO, S.M. ORC Condenser Heat Exchanger Design and Modeling. *International Journal of Engineering Research & Technology,* v. 4, Issue 8, p. 279-286, 2015.

SNOSWELL, M. A novel technique for the measurement of disruption in high-pressure homogenization: Studies on E. coli containing recombinant inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 38, n. 4, p. 363-370, 1991.

SOUZA, S.F.R.; CABRAL, S. FMEA and PMBOK Applied To Project Risk Management. *Journal of Information Systems and Technology Management,* v. 5, n. 2, p. 347-354, 2008.

SPARTACO, A.S., et al. Noções básicas de tecnologia do ADN recombinante. Ed: EDUA, 2005, ISBN: 85-7401-087-1

SPELTER, L. E.; STEIWAND, A.; NIRSCHL, H. Processing of dispersions containing fine particles or biological products in tubular bowl centrifuges. *Chem. Eng. Sci.*, v. 65, p. 4173–4181, 2010.

STAMATIS, D. H., *Failure Mode and Effect Analysis: FMEA from theory to execution*. ASQ Quality Press, 2nd ed., Milwaukee, Winsconsin, 2003.

STROOCK, D. W. *An Introduction to Markov Processes*, Springer, 2005.

SWAMINATHAN, N.R.; DIWAKAR REDDY, V.; KRISHNAIAH, G.; VENKATESWARLU. Design and Fabrication of a Pump for Peristaltic Flow of variable viscosity fluids. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, v. 2, Issue 12, p. 47-52, 2013.

SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; COVAS, D.T. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expres. Purif.*, v. 84, p. 147–153, 2012.

TAIT, K. D., Pharmaceutical Industry. Encyclopedia of Occupational Health and Safety, Editor-in-Chief. International Labor Organization, Geneva, 2011. Disponível em: <http://www.iloencyclopaedia.org/part-xii-57503/pharmaceutical-industry>Acesso em: 15 mar. 2015.

TAKAGI, D.; BALMFORTH, N.J. Peristaltic pumping of viscous fluid in an elastic tube. *J. Fluid Mech.*, v. 672, p. 196-218, 2011.

TASSOU, S.A.; GREEN, R.K. A mathematical model of the heat transfer process in a shell and tube condenser for use in refrigeration applications. *Appl. Math. Model.*, v. 5, Issue 1, p. 29-33, 1981.

TESAŘOVÁ, M.; HRADY, N. Optimization of growth condition Escherichia coli culture by method Design of experiments to produce optimal amount of studied genetically insert protein,*University of South Bohemia, Institute of Physical Biology*, Czech Republic, 2011.

THATCHER, D.R. Recovery of therapeutic proteins from inclusion bodies: problems and process strategies. *Biochemical Society Transactions*, v. 18, p.234-235, 1989.

THEODORE L., *Heat transfer applications for the practicing engineer*, Wiley, New Jersey, 2011.

TOLVER, A. *An Introduction to Markov Chains*, Department of Mathematical Sciences, University of Copenhagen, Denmark, 2016. Disponível em: <http://www.math.ku.dk/noter/filer/stoknoter.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

TRIEBNIGG, A. *A internacionalização da indústria farmacêutica brasileira: um caminho sem volta. Revista Interesse Nacional*, 3º edição, 01 de outubro de 2008. Disponível em: <http://interessenacional.uol.com.br/2008/10/a-internacionalizacao-daindustriafarmaceutica-brasileira-um-caminho-sem-volta/>. Acesso em: 10 dez. 2014.

TROUP, G. M.; GEORGAKIS, C. Process systems engineering tools in the pharmaceutical industry. *Computers and Chemical Engineering*, v. 51, p. 157– 171, 2013.

ULLAH, S. Creation and Implementation of Process FMEA with Focus on Risk Reduction for Packaging Process. *Culminating Projects in Mechanical and Manufacturing Engineering*, Paper 9, 2015.

UNGUREANU, A.L.; STAN, G. Improving FMEA risk assessment through reprioritization of failures. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, v. 145, p. 1-7, 2016.

Van HEE, P.; MIDDELBERG, A.P.; VAN DER LANS, R.G.; VAN DER WIELEN, L.A. Relation between cell disruption conditions, cell debris particle size, and inclusion body release. *Biotechnol.Bioeng.*, v. 88, Issue 1, p.100-110, 2004.

Van LEEUWEN, J. F.; NAUTA, M. J.; DE KASTE, D.; ODEKERKEN-ROMBOUTS, Y. M.; OLDENHOF, M. T.; VREDENBREGT, M. J.; BARENDS, D. M. Risk analysis by FMEA as an element of analytical validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 50, Issue 5, p. 1085-87, 2009.

VEERAMANY, A. et al. Framework for Modeling HighImpact, Low-Frequency Power Grid Events to Support RiskInformed Decisions. *U.S. Department of Energy*, Pacific Northwest National Laboratory Richland, Washington, 2015.

VERITAS, D.N. Recommended Practice DNV-RP-G 101: Risk Based Inspection of Offshore Topside Static Mechanical Equipment. *Det Norske Veritas*, Høvik, 2009.

VINCENT, D.W.; HONECK, B. Risk Management Analysis Techniques for Validation Programs. *Journal of Validation Technology*, v. 10, n. 3, 2004.

VLĂDUȚ-SEVERIAN, I. Risk management and evaluation and qualitative method within the projects. *ECOFORUM*, v 3, Issue 1, n. 4, 2014.

WAGNER, C. A Note on Ruin In A Two State Markov Model. *ASTIN BULLETIN*, v. 32, n. 2, p. 349-358, 2001.

WALKER, G.M., *Media for industrial fermentations*, C.A. Batt, M.L. Tortorello, eds. Encyclopedia of Food Microbiology, London: Academic Press, vol. 1, pp. 769-777, 2014.

WALLACH D., MAKOWSKI D., JONES J. W., BRUN F., *Chapter 10 - Putting It All Together in a Case Study, In Working with Dynamic Crop Models* (Second Edition), Academic Press, San Diego, pp. 407-436, 2014.

WALSH, G. *Biopharmaceuticals, Biochemistry and Biotechnology* (Second Edition), Wiley, Chichester, UK, 2002.

WANG, L.; BI, Z.M. Challenges for Better Sustainable Manufacturing. *Advances in sustainable and competitive Manufacturing Systems*, A. Azevedo, Ed. Switzerland: Springer International Publishing, p. 1209-1221, 2013.

WANG, Y-H.; ZHANG, X. Influence of agitation and aeration on growth and antibiotic production by Xenorhabdus nematophila. *World J. Microbiol.Biotechnol.*, v. 23, p. 221-227, 2006.

WATSON-MARLOW. Peristaltic Pumps for Engineers. Disponível em: <http://www.watson-marlow.com/Documents/knowledgehub/Brochures/gb%20-%20UK/Product/Watson%20Marlow%20UK/b-OEM-gb-02.pdf>. Acceso em: 17 dez. 2016.

WEESE, J.S.; PRESCOTT, J.F. Assessment of laboratory and biosafety practices associated with bacterial culture in veterinary clinics. *JAVMA-J. Am. Vet. Med. A.*, v. 234, n. 3, p. 352-358, 2009.

WESTGARD, J. O. Perspectives on quality control, risk management, and analytical quality management. *Clin. Lab. Med.*, v. 33, p. 1–14, 2013.

WHEELER, D.J. Problems with Risk Priority Numbers - Avoiding more numerical jabberwocky. *Quality Digest Daily*, p. 1-4, July, 2011.

WICKBOLDT, J.A. et al. Improving IT change management processes with automated risk assessment. *20th IFIP/IEEE International Workshop on Distributed Systems: Operations and Management (DSOM), LNCS,* Venice Italy, v. 5841, p. 71–84, 2009.

WIDDEL F., *Theory and Measurement of Bacterial Growth, Basic practical microbiology,* University Bremen, pp. 11, 2010.

WILLEY, R.J. Layer of Protection Analysis. *Procedia Engineer.,* v. 84, p. 12-22, 2014.

WONG, H.H.; O'NEILL, B.K.; MIDDELBURG, A.P.J. Centrifugal Processing of Cell Debris and Inclusion Bodies from Recombinant Escherichia coli. *Bioseparatio*n, v. 6, n. 6, p. 361–372, 1996.

WONG, H.H. Modelling studies of the interaction between homogenization, centrifugation, and inclusion body dissolution. Tese (Doutorado em Engenharia) – Deparment of Chemical Engineering, University Adelaide, 1997.

XIANGYU, P.; LETIAN, J.; GUOZHI, X. Reliability Modeling Method Based on State Truncation and Error Bound Analysis. *Proc. IEEE Symp. Communications, Circuits and Systems Proceedings (ICCCAS 05)*, IEEE Press, July, pp. 2791-2795, 2006.

XIAO, N.; HUANG, H. Z.; LI, Y.; HE, L.; JIN, T. Multiple failure modes analysis and weighted risk priority number evaluation in FMEA. *Eng. Fail Anal.*, v. 18, p. 1162-1170, 2011.

YANG, F. et al. Validating FMEA output against incident learning data: A study in stereotactic body radiation therapy. *Med. Phys.*, v. 42, p. 2777–2785, 2015.

YANG G. Life Cycle Reliability Engineering. *John Wiley & Sons*, 1st edition, 2007.

YANG, T.; HUANG, Y.; HAN, Z.; LIU, H.; ZHANG, R.; XU, Y. Novel disposable flexible bioreactor for Escherichia coli culture in orbital shaking incubator. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 116 n. 4, p. 452-459, 2013.

YASID, N.A.B. Metabolite analysis of Escherichia coli in response to changes in oxygen levels. 2013. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Biología Molecular e Biotecnología, Universidade de Sheffield, Sheffield, Inglaterra.

YIN, G.; GARCES, E.; YANG, J. Aglycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scale in vitro transcription-translation system. mAbs, v. 4, Issue 2, p. 217–225, 2012.

YUJUAN, X.; XIANHUI, Y. Application of Fault Tree Analysis Technique for Calculation of Transmitter's Failure Probability. *Automation in Petro-Chemical Industry*, v. 3, March. p. 1-5, 2007.

ZHANG, Y.; BAI, Y. Reliability Analysis and Safety Evaluation of an Analog Output Module Based on FMEA and FTA. *International Conference on Computer and Automation Engineering (ICCAE)*, v. 44, n.11, p.60-64, 2012.

ZHAO, P.; ZHANG, X. Risk Assessment Method of ERP Based on Risk Matrix. *Informalization of Manufacturing Industry*, v. 13, n. 2, p. 87-88, 2005.

ZHAO, Q.; DENG, D.; LIU, Y.; CHEN, W.; WANG, J.; XIANG, J.; HU, S. The Condenser Performance Test and Thermal Performance Analysis of Variable Conditions in TQNPC. *Energy Power Eng.*, v. 5, p. 566-569, 2013.

ZIETLOW, D. C. Heat transfer and flow characteristics of condensing refrigerants in small-channel cross-flow heat exchangers. Tese (Doutorado em Engenharia Mecanica) - Mechanical Science and Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, 1995.

ANEXO A – Relatório de Análise de Risco utilizando a metodologia integrada

Relatório de Análise de Riscos - 1

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ	Etapa	Equipamentos	Versão:
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Propagação Celular	Shaker/Incubadora, Cabine de Segurança Biológica, Bomba Peristáltica	2018
Elaborado por: Miguel Angel de la O Herrera	**Operações Unitárias:** Agitação, Transferência de Calor, Filtração, Bombeamento Peristáltico		
	Descrição: Etapa de processo destinada para transformação de um banco de células em um cultivo para produção de biomassa recombinante. O processo é realizado dentro de um shaker/incubadora com controle de temperatura. A manipulação do produto é realizada dentro de um módulo de uma cabine de segurança biológica.		

Equipamento: Shaker/Incubadora

Nó 1 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Agitação	Não	- O equipamento encontra-se com defeito - Equipamento desligado	- O equipamento conta com registro - O sistema conta com alarme - Equipamento qualificado e verificado antes da operação	- Parada de processo - Crescimento baixo o nulo dos microrganismos no cultivo - Descarte do cultivo	8	2	3	3	48	72	- Estabelecer programas de treinamento - Elaboração de procedimentos de verificação antes da operação - Aplicação dos procedimentos operacionais padrão
2		Menos	- O equipamento encontra-se com defeito - Parâmetro de operação incorreto		- Crescimento baixo dos microrganismos no cultivo - Baixo rendimento do cultivo - Possível descarte do cultivo	6	3	4	3	54	72	
3		Mais	- O equipamento encontra-se com defeito - Parâmetro de operação incorreto		- Impacto do recipiente de contenção - Possível descarte do cultivo - Impacto negativo no equipamento	6	3	4	3	54	72	

Nó 2 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Equipamento não calibrado - Parâmetro de operação incorreto - Falha no isolamento térmico - Falha no controlador térmico	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Sensor de temperatura - Alarme e registrador de eventos	- Baixo crescimento dos microrganismos no cultivo - Possível descarte do cultivo	6	4	5	3	72	90	- Verificação visual do funcionamento do equipamento - Monitoramento do perfil de temperatura ao longo da operação - Estabelecer programas de treinamento
2		Mais	- Equipamento não calibrado - Parâmetro de operação incorreto - Falha no controlador térmico		- Morte do MO - Descarte do cultivo	8	4	5	3	96	120	

Equipamento: Cabine de segurança biológica

Nó 3 - Filtração

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Vazão (Ar)	Não	- Filtro HEPA saturado - O motor do ventilador não funciona	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Teste de integridade do filtro	- Possibilidade de contaminação do cultivo / Descarte do produto - Possibilidade de contaminação da área	8	3	4	6	144	192	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Estabelecer limites de saturação do filtro
2		Menos	- Falha no motor do ventilador - Filtro HEPA parcialmente saturado		- Possibilidade de contaminação do cultivo / Descarte do produto - Possibilidade de contaminação da área	8	4	5	6	192	240	
3		Mais	- O filtro HEPA não foi instalado ou está rompido - Falhas no funcionamento do motor do ventilador		- Possibilidade de contaminação do cultivo / Descarte do produto	8	4	5	6	192	240	

Equipamento: Bomba Peristáltica

Nó 4 - Bombeamento Peristáltico (transferência do cultivo para o biorreator)

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Volume (liquido no flexível)	Não	- Não existem cultivo no sifão - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - O peso do recipiente com o cultivo é monitorados online ao longo da transferência para o biorreator - Indicador de peso	- Não há transferência para o biorreator - A operação deve de ser interrompida	8	2	3	3	48	72	- Monitoramento continuo longo do processo - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
2		Menos	- Bolhas de ar na tubulação flexível - Tubulação flexível obstruída - Tubulação flexível rompida		- Incremento do tempo de transferência do cultivo para biorreator - Perda na temperatura do cultivo	6	4	5	3	72	90	
3	Rotação (Roletes)	Menos	- Colocação errada da tubulação flexível - Problemas mecânicos no motor	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - Indicador de peso - O equipamento é validado antes da operação	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - Aumento no tempo de transferência do cultivo e possível morte celular	6	2	3	6	72	108	- Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
4		Mais	- Problemas mecânicos no motor - Falha do inversor de frequência		- Perda de controle da velocidade de transferência do cultivo	2	2	3	6	24	36	
5	Vazão	Não	- Não cultivo no sifão - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - Indicador de peso - O equipamento é validado antes da operação	- A operação deve ser interrompida - Não há transferência para o biorreator	8	2	3	3	48	72	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Estabelecer programas de treinamento - Monitoramento da vazão da solução ao biorreator - Analisar a viabilidade de continuar com o processo - Estabelecer procedimento de parada de emergência
6		Menos	Ver ponto 2 - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito (RPM baixo)		- Incremento do tempo de transferência do cultivo para biorreator - Perda na temperatura do cultivo	6	4	5	3	72	90	
7		Mais	- Equipamento com defeito (RPM alto)	- O equipamento é validado antes da operação - Indicador de peso	- Perda de controle da velocidade de transferência do cultivo	2	2	3	3	12	18	

Relatório de Análise de Riscos - 2

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ	Etapa	Equipamentos envolvidos	Data
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Biorreação	Biorreator de 600 L, Biorreator de 100 L, Tanque de Colheita, Bombas Peristálticas, Freezers, Condensadores, Trocadores de Calor, Fluxo Laminar	2018
Elaborado por: Miguel Angel de la O Herrera	**Operação Unitárias:** Agitação, Transferência de Calor, Absorção, Filtração, Bombeamento, Condensação		
	Descrição: Sistema integrado de biorreação e colheita destinado para crescimento celular e produção de proteínas recombinantes.		

Equipamento: Biorreatores (100-600L)

Nó 1 - Absorção

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Velocidade especifica de respiração	Não	- Falta de O2 na entrada do biorreator - Linha de entrada com vazamento - Falha na abertura da válvula de alimentação de O2 na entrada do biorreator	- Sensor de oxigênio dissolvido - O sistema conta com controle de válvulas automatizado (IHM)	- Morte celular - Perda de produto - Parada de processo	8	3	4	2	48	64	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades antes do inicio do processo - Monitoramento on-line da vazão e concentração de O2 e CO2 no biorreator
2		Menos	- Falha no fornecimento de O2 na entrada do biorreator - Linha de entrada com vazamento - Alta concentração celular (baixa concentração de O2) - Alto volume de meio no biorreator - Ver Nó 3 - AGITAÇÃO	- Sensor de nível - Ajuste automático da velocidade de agitação (IHM) - Sensor de oxigênio dissolvido	- Taxa de crescimento baixa - Morte celular - Perda de produto - Parada de processo	8	4	5	2	64	80	- Treinamento do pessoal - Aplicar recomendações do Nó 3 - Agitação

Nó 2 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Velocidade	Não	- Falha no funcionamento do motor	- O equipamento é validado periodicamente	- Não há distribuição de O2 necessária para o processo - Baixa transferência de calor entre a camisa do tanque e o meio - Crescimento celular baixo -Baixa Produção de proteína - A Limpeza e Higienização do equipamento pode ser ineficiente - Descumprimento regulatório - Parada do processo	9	2	3	2	36	54	- Testar o agitador com agua purificada antes de adicionar sólidos - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
2		Menos	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto - Agitador colocado em posição incorreta	- Tacômetro em linha		9	3	4	2	54	72	- Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no - Testar o agitador com agua purificada antes de adicionar - Aplicar procedimentos de validação
3		Mais	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto	- O equipamento é validado periodicamente - Sensor de nível - Tacômetro em linha	- Formação de espuma - O sensor de nível apresentará dados incorretos	5	2	3	2	20	30	- Aplicar procedimentos de validação - Manter alto volume de antiespumante no tanque

Nó 3 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Velocidade do agitador baixa - Válvulas de alimentação das utilidades para controle da temperatura estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Utilidade fora dos parâmetros de processo	- Sensores de temperatura - O sistema possui alarme visual e sonoro - Os pontos de alimentação são validados periodicamente	- Parada de processo - Baixo crescimento celular - Baixa produção de proteína - Falha na esterilização - Contaminação do cultivo - Descumprimento regulatório - Temperatura de operação fora do parâmetro de processo (37 C)	9	3	4	2	54	72	- Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no equipamento) - Analisar a viabilidade de continuar com o processo - Testar o agitador com agua purificada antes de adicionar sólidos - Aplicar procedimentos de validação
2		Mais	- Utilidade fora dos parâmetros de processo		- Morte celular - Parada de processo	9	3	4	2	54	72	- Desenvolver testes para estabelecer limites máximos de velocidade de agitação

Nó 4 - Filtração

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Vazão(Ar)	Não	- Filtro HEPA saturado - Tubulação obstruída - Uma o várias válvulas na linha estão fechadas/bloqueadas	- Existe um sistema de filtros dedicado na entrada de gases de processo e outro na saída de gases de exaustão	- Não há transferência do cultivo entre tanques (sem pressurização) - Não acontecerá a secagem durante a limpeza e esterilização - Descumprimento regulatório - Incremento da concentração de gases de exaustão dentro do tanque	9	2	3	3	54	81	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Estabelecer limites de saturação do filtro
2		Menos	- Filtro HEPA parcialmente saturado - Uma o várias válvulas na linha parcialmente fechadas/bloqueadas - Tubulação parcialmente obstruída	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Teste de integridade do filtro - Medidor de vazão de ar	- Incremento do tempo de transferênc cultivo entre tanques A limpeza e esterilização é ineficiente - Descumprimento regulatório	9	4	5	3	108	135	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Trocar periodicamente os filtros antes de chegar a saturação
3		Mais	- O filtro HEPA não foi instalado ou está rompido - Aumento da pressão do sistema	- Sensor de pressão	- Não há retenção de contaminantes nos gases de processo - Não há retenção de MO nos gases de exaustão	9	4	5	3	81	108	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação

Nó 5 - Condensação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- A temperatura de fluido frio é superior à necessária - Baixa velocidade de fluxo mássico do fluído frio	- Sensor de temperatura - Medidor de vazão - O sistema possui alarme visual e sonoro	- Baixa recuperação de células arrastradas nos gases de exaustão - Aumento na velocidade de saturação dos filtros de gases de exaustão	8	3	4	2	48	64	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Monitorar ao longo do processo a temperatura de gases de exaustão - Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer limites de saturação do filtro
2	Vazão	Não	- Não há fornecimento da utilidade fria - Válvula de entrada da utilidade fria está fechada/bloqueada		- Não há redução da temperatura - Baixa recuperação de células arrastradas nos gases de exaustão - Aumento na velocidade de saturação dos filtros de gases de exaustão	8	3	4	2	48	64	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Monitorar ao longo do processo a temperatura de gases de exaustão - Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer limites de saturação do filtro
3		Menos	- Válvula de entrada da utilidade fria está fechada/bloqueada - Utilidade fornecida fora dos parâmetros necessarios		- Redução da temperatura insuficiente para o processo - Baixa recuperação de células arrastradas nos gases de exaustão - Aumento na velocidade de saturação dos filtros de gases de exaustão	8	3	4	2	48	64	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Monitorar ao longo do processo a temperatura de gases de exaustão - Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer limites de saturação do filtro

Equipamento: Bombas peristálticas

Nó 6 - Bombeamento Peristáltico (soluções)

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Volume (liquido no flexível)	Não	- Não existem soluções nos recipientes do equipamento - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - Sensor de pH - O peso dos recipientes com soluções são monitorados online ao longo do processo - Sensor de condutividade	- A operação deve ser interrompida - Crescimento microbiano baixo - Produção de proteínas baixa - Vazamento na área de operação	8	2	3	2	32	48	- Monitoramento continuo longo do processo - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
2		Menos	- Consumo rápido de soluções - Bolhas de ar na tubulação flexível - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída		- Crescimento microbiano baixo - Produção de proteínas baixa - Vazamento na área de operação	6	4	5	2	48	60	
3	Rotação (Roletes)	Menos	- Colocação errada da tubulação flexível - Problemas mecânicos no motor	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - O equipamento é validado antes da operação	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - Menor volume de soluções adicionadas ao biorreator (Crescimento microbiano e produção de proteínas baixa)	6	2	3	6	72	108	- Treinamento dos operários - Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
4		Mais	- Problemas mecânicos no motor - Falha do inversor de frequência		- Maior volume de soluções adicionadas ao biorreator (Crescimento microbiano e produção de proteínas baixa)	6	2	3	6	72	108	
5	Vazão	Não	- Não existem soluções nos recipientes do equipamento - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - Senor de pH - Sensor de condutividade - O equipamento é validado antes da operação	- A operação deve ser interrompida - Crescimento microbiano baixo - Produção de proteínas baixa - Vazamento na área de operação	8	2	3	2	32	48	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Treinamento dos operários - Monitoramento da vazão da solução ao biorreator - Analisar a viabilidade de continuar com o processo - Estabelecer procedimento de parada de emergência
6		Menos	Ver ponto 2 - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito (RPM baixo)		- Crescimento microbiano baixo - Produção de proteínas baixa	6	4	5	2	48	60	
7		Mais	- Equipamento com defeito (RPM alto)	- O equipamento é validado antes da operação	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - A operação deve ser interrompida	6	2	3	2	24	36	

Equipamento: Trocadores de Calor

Nó 7 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Perda no isolamento do sistema - Trocador de calor com defeito - Válvulas de alimentação das utilidades estão parcialmente bloqueadas/fechadas Utilidade fora dos parâmetros de processo	- O sistema possui alarme visual e sonoro - Os pontos de alimentação são validados periodicamente - Sensores de temperatura	- A temperatura de processo não será atingida - O equipamento não sera esterilizado	9	3	4	2	54	72	- Aplicar procedimentos de manutenção do equipamento - Estabelecer procedimentos de verificação dos parâmetros das utilidades em conjunto com a área responsável pela geração - Treinamento do pessoal
2		Mais	- Utilidade fria fora dos parâmetros estabelecidos para o processo		- Potencial inativação do microorganismo	9	3	4	2	54	72	

3	Vazão	Não	- Não há fornecimento de vapor industrial - Válvulas de alimentação das utilidades para controle de temperatura estão bloqueadas/fechadas	- Os pontos de alimentação são validados periodicamente - Sensores de temperatura - O sistema possui alarme visual e sonoro - Medidor de vazão (na entrada das utilidades)	- Ver parâmetro Temperatura - Utilidades para o processo fora dos parâmetros estabelecidos	9	3	4	2	54	72	- Estabelecer procedimentos de verificação visual das válvulas de alimentação das utilidades antes de iniciar o processo - Treinamento do pessoal - Aplicar procedimentos de manutenção do equipamento - Estabelecer procedimentos de verificação dos parâmetros das utilidades em conjunto com a área responsável pela geração
4		Menos	- Utilidade fornecida fora dos parâmetros de processo - Válvulas de alimentação das utilidades estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Trocador ou tubulação com vazamentos			9	3	4	2	54	72	

Equipamento: Tanque de Colheita (600 L)

Nó 8 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Velocidade	Não	- Falha no funcionamento do motor	- O equipamento é validado periodicamente - Tacômetro em linha	- Baixa transferência de calor entre a camisa do tanque e o meio - Sedimentação de biomassa (pode dificultar a próxima etapa) - A Limpeza e Higienização do equipamento pode ser ineficiente - Descumprimento regulatório	9	2	3	2	36	54	- Testar o agitador com agua purificada antes de adicionar sólidos - Analisar a viabilidade de continuar com o processo
2		Menos	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto - Agitador colocado em posição incorreta			9	3	4	2	54	72	- Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no - Testar o agitador com agua purificada antes de adicionar - Aplicar procedimentos de validação
3		Mais	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto	- O equipamento é validado periodicamente - Sensor de nível	- Formação de espuma - O sensor de nível apresentará dados incorretos	5	2	3	2	20	30	- Manter alto volume de antiespumante no tanque - Aplicar procedimentos de validação

Nó 9 - Transferência de Calor (Tanque de Colheita)

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Válvulas de alimentação das utilidades para controle da temperatura estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Utilidade fora dos parâmetros de process	- O sistema possui alarme visual e sonoro - Os pontos de alimentação são validados periodicamente - Sensores de temperatura	- Processo fora dos parâmetros de controle - Esterilização ineficiente - Descumprimento regulatório	9	3	4	2	54	72	- Aplicar procedimentos de manutenção - Estabelecer protocolos de verificação visual da temperatura nos sensores antes e durante o - Aplicar procedimentos de validação
2		Mais	- Utilidade fora dos parâmetros do process		- Não haverá resfriamento do cultivo (A atividade metabólica do MO não será reduzida)	5	3	4	2	30	40	

Equipamento: Freezers

Nó 10 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- Problema mecânico - Falha elétrica - Falha na vedação do equipamento - Vazamento do gás refrigerante	- Registrador de temperatura - O sistema possui alarme visual e sonoro	- Biomassa fora dos parâmetros de processo - Possível descarte do produto	8	3	4	3	72	96	- Monitorar ao longo do processo a temperatura no registrador - Estabelecer programas de treinamento - O equipamento deve de ser ligado a uma unidade de backup elétrico

Equipamento: Fluxo Laminar

Nó 11 - Filtração

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Vazão (Ar)	Não	- Filtro HEPA saturado - O motor do ventilador não funciona	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Teste de integridade do filtro	- Possibilidade de contaminação das amostras	3	3	4	6	54	72	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Estabelecer limites de saturação do filtro
2		Menos	- Falha no motor do ventilador - Filtro HEPA parcialmente saturado		- Possibilidade de contaminação das amostras	3	4	5	6	72	90	
3		Mais	- O filtro HEPA não foi instalado ou está rompido		- Possibilidade de contaminação das amostras	3	4	5	6	72	90	

Relatório de Análise de Riscos - 3			
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ	**ETAPA**	**Equipamentos envolvidos**	Data:
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química Universidade do Estado do Rio de Janeiro	Centrifugação do cultivo	Centrifuga Tubular de Fluxo Contínuo, Bomba Peristáltica, Tanque de Inativação, Módulo de recuperação de Aerossóis, Fluxo Laminar	2018
Elaborado por: Miguel Angel de la O Herrera	**Operações Unitárias:** Centrifugação, Bombeamento, Transferência de Calor, Agitação, Filtração		
	Descrição: Esta etapa tem como objetivo a recuperação da biomassa contendo proteínas utilizando uma centrífuga tubular de fluxo continuo. Após a separação o sobrenadante obtido será inativado num tanque de inativação térmica em cumprimento com normas estabelecidas pelo órgao regulatorio.		

Equipamento: Centrífuga Tubular de Fluxo Continuo

Nó 1 - Centrifugação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	F_o	F_a	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Tempo (residência dos sólidos no rotor)	Menos	- A vazão é muito elevada - O volume do liquido dentro do rotor é baixo	- Medidor de vazão instalado na entrada do equipamento	Baixa recuperação de sólidos Perda de produto	7	4	5	6	168	210	- Estabelecer protocolos de medição de D.O na seguinte etapa (tanque de inativação)
2		Mais	- Vazão baixa do liquido		Biomassa recuperada com baixo conteúdo de humidade Queda na eficiência de ruptura celular	3	4	5	6	72	90	- Durante os lotes de engenharia deverá de ser determinada vazão ótima
3	Vazão	Não	- Não existe produto na entrada do equipamento - Rompimento da tubulação de entrada	- Medidor de vazão instalado na entrada do equipamento - Ajuste automático da vazão no do sistema de biorreação (IHM)	A operação deve ser interrompida	8	2	3	2	32	48	- Verificação visual da tubulação de transferência
4		Menos	- O cultivo é transferido desde o tanque de colheita a uma vazão fora dos parâmetros do processo - Tubulação rompida - Vazamentos na conexão entre sistemas		Biomassa recuperada com baixo conteúdo de humidade Queda na eficiência de ruptura celular (seguinte etapa)	3	4	5	2	24	30	- Durante os lotes de engenharia deverá de ser determinada vazão ótima
5		Mais	- O cultivo é transferido desde o tanque de colheita a uma vazão fora dos parâmetros do processo		- Baixa recuperação de sólidos - Perda de produto	7	4	5	2	56	70	- Estabelecer protocolos de medição de D.O na seguinte etapa (tanque de inativação)
6	Nível (Sólidos)	Menos	- Baixa concentração celular - A vazão é muito elevada	- Controle em processo para determinação do crescimento - Medidor de vazão instalado na entrada do equipamento	Baixa recuperação de sólidos Perda de produto	6	4	5	6	144	180	- Estabelecer protocolos de medição de D.O na seguinte etapa (tanque de inativação)

Nó 2 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	F_o	F_a	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- A temperatura de fluido frio é superior à necessária - Baixa pressão do liquido para resfriamento	- Sensor de temperatura - Manómetro	- Superaquecimento no equipamento - Aquecimento da biomassa - Perda de produto - Interrupção da operação -Avaria do equipamento	9	3	4	3	81	108	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Estabelecer programas de treinamento

Equipamento: Bombas peristálticas

Nó 3 - Bombeamento Peristáltico

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	F_o	F_a	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Volume (liquido no flexível)	Não	- Não existe produto derivado da etapa anterior - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual	- A operação deve ser interrompida - Contaminação da área de operação	8	2	3	6	96	144	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo
2		Menos	- Bolhas de ar na tubulação flexível - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída		- Contaminação da área de operação - A operação deve ser interrompida	6	4	5	6	144	180	
3	Rotação (Roletes)	Menos	- Colocação errada da tubulação flexível - Problemas mecânicos no motor	- Medidor de vazão na etapa anterior (centrífuga)	- Aumento do esforço dos rolos - É possível que a centrifuga não tenha a força necessária para transferir o sobrenadante ao tanque de inativação, retorno de liquido na centrifuga - A operação deve ser interrompida	6	2	3	6	72	108	- Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer programa de manutenção preventiva
4		Mais	- Problemas mecânicos no motor - Falha do inversor de frequência	- Medidor de vazão na etapa posterior (tanque de inativação)	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor	7	2	3	6	84	126	
5	Vazão	Não	- Não existe produto derivado da etapa anterior - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo - Medidor de vazão na etapa anterior (centrífuga)	- A operação deve ser interrompida	8	2	3	3	48	72	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo
6		Menos	Ver ponto 2 - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito (RPM baixo)	- O equipamento é validado antes da operação	- É possível que a centrifuga não tenha a força necessária para transferir o sobrenadante ao tanque de inativação, retorno de liquido na centrifuga	6	4	5	3	72	90	- Estabelecer programas de treinamento - Monitoramento da vazão no tanque de inativação do cultivo
7		Mais	- Equipamento com defeito (RPM alto)	- O equipamento é validado antes da operação	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - A operação deve ser interrompida	7	2	3	3	42	63	- Estabelecer procedimento de parada de emergência

Equipamento: Tanque de Inativação

Nó 4 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Velocidade	Não	- Falha no funcionamento do motor	- O equipamento é validado periodicamente - Tacômetro em linha	- Baixa transferência de calor entre a camisa do tanque e o meio - A Limpeza e Higienização do equipamento pode ser ineficiente - Descumprimento regulatório	8	2	3	2	32	48	- Testar o agitador com agua antes de começar o processo - Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no - Aplicar procedimentos de validação
2		Menos	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto - Agitador colocado em posição incorreta			8	3	4	2	48	64	
3		Mais	- Falha no controlador do equipamento	- O equipamento é validado periodicamente - Sensor de nível - Tacômetro em linha	- Formação de espuma	5	2	3	2	20	30	- Aplicar procedimentos de validação - Estabelecer programa de manutenção

Nó 5 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Válvulas de alimentação das utilidades estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Baixa vazão de vapor industrial - Trocador de calor com defeito	- Os pontos de alimentação são validados periodicamente - Sensores de temperatura - O sistema possui alarme visual e sonoro	- Incremento do tempo de aquecimento para inativação - Falha na inativação - Descumprimento regulatório	9	3	4	2	54	72	- Aplicar procedimentos de - Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no equipamento) - Estabelecer procedimentos de verificação dos parâmetros das utilidades em conjunto com a área responsável pela geração

Equipamento: Fluxo Laminar

Nó 6 - Filtração

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Vazão (Ar)	Não	- Filtro HEPA saturado - O motor do ventilador não funciona	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Teste de integridade do filtro	- Não há recuperação de particulas geradas durante a centrifugação - Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias	8	3	4	6	144	192	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Estabelecer limites de saturação do filtro
2		Menos	- Falha no motor do ventilador - Filtro HEPA parcialmente saturado		- Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias	6	4	5	6	144	180	
3		Mais	- O filtro HEPA não foi instalado ou está rompido		- Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias - Não há recuperação de particulas geradas durante a centrifugação	8	4	5	6	192	240	

Relatório de Análise de Riscos - 4

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ	ETAPA	Equipamentos envolvidos	Data:
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química **Universidade do Estado do Rio de Janeiro**	Ruptura Celular	Homogeneizador de Alta Pressão, Bomba Peristáltica, Tanques de Processo	2018
Elaborado por: Miguel Angel de la O Herrera	**Operações Unitárias: Compressão, Bombeamento, Agitação, Mistura, Troca de Calor, Filtração**		
	Descrição: Etapa destinada à ruptura celular para recuperação dos corpos de inclusão (proteína)		

Equipamento: Homogeneizador de Alta Pressão

Nó 1 - Compressão

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Pressão	Não	- Falha do motor - Válvula de homogeneização rompida - Falha na vedação da câmara de homogeneização	- Manómetro na entrada da camara de homogeneizaão	- Não há rompimeno celular - Parada do processo	8	2	3	2	32	48	- Aplicar procedimentos de validação de equipamentos
2		Menos	- Falha do motor - Válvula de homogeneização rompida - Falha na vedação da câmara de homogeneização - Parâmetro de operação errado	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação -Monitoramento e controle da operação no painel (IHM) - Alarmes no sistema	- Necessidade de reprocesso - Perda de produto	6	3	4	2	36	48	- Se for verificado o correto funcionamento dos equipamentos envolvidos durante a ruptura, será necessário avaliar a viabilidade de continuar o processo ou parar a operação
3		Mais	- Parâmetro de operação errado - Válvula fechada/bloqueada na saída do homogeneizador - A válvula de homogeneização bloqueia a passagem do líquido		- Desgaste de componentes do equipamento - Explosão da câmara de homogeneização - Danos ao equipamento, área e operários	10	2	3	2	40	60	- Estabelecer procedimento de parada de emergência do equipamento - Estabelecer protocolos de evacuação de emergência - Estabelecer programa de treinamento - Estabelecer programa de manutenção preventiva

Nó 2 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- A temperatura do fluido de resfriamento no tanque do looping-asséptico é superior à necessária - Vazão baixa do fluído de resfriamento do homogeneizador	- Sensor de temperatura - Medidor de vazão	- Superaquecimento no equipamento - Aquecimento do produto lisado - Perda de produto - Interrupção da operação	9	3	4	3	81	108	- Verificar nível de agua no tanque do looping-asséptico - Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Estabelecer programas de treinamento

Equipamento: Bombas peristálticas

Nó 3 - Bombeamento Peristáltico

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Volume (liquido no flexível)	Não	- Não existe produto no tanque de - Tubulação flexível rota - Tubulação flexível obstruída	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual - Medidor de vazão na entrada do homogeneizador	- Atrito e quebra da válvula de homogeneização - Interrupção da operação	9	2	3	6	108	162	- Seguir procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo
2		Menos	- Alta concentração de bolhas de ar na - Tubulação flexível rota - Tubulação flexível obstruída		- Atrito e quebra da válvula de homogeneização	9	4	5	6	216	270	- Estabelecer programas de treinamento - Utilizar tubulação flexível
3	Rotação (Roletes)	Menos	- Colocação errada da tubulação flexível - Problemas mecânicos no motor	- Medidor de vazão na entrada do homogeneizador	- A vazão pode apresentar um perfil pulsante, esse fenómeno tem os mesmos efeitos do ponto 2.	9	2	3	6	108	162	- Estabelecer programas de treinamento
4		Mais	- Problemas mecânicos no motor - Falha do inversor de frequência		- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor	7	2	3	6	84	126	
5	Vazão	Não	- Não existe produto derivado da etapa - Tubulação flexível rota - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual	- Interrupção da operação - Estouro da válvula de homogeneiza por falta de líquido	9	2	3	2	36	54	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Estabelecer programas de treinamento
6		Menos	Ver ponto 2 - Tubulação flexível rota - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito (RPM baixo)	- O equipamento é validado antes da operação	- A vazão pode apresentar um perfil pulsante, esse fenómeno tem os mesmos efeitos do ponto 2.	9	4	5	2	72	90	- Monitoramento da vazão na entrada do homogeneizador
7		Mais	- Equipamento com defeito (RPM alto)	- Medidor de vazão na entrada do homogeneizador	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - Interrupção da operação	7	2	3	2	28	42	- Estabelecer procedimento de parada de emergência

Equipamento: Tanques de Processo

Nó 4 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Velocidade	Não	- Falha no funcionamento do motor	- O equipamento é validado periodicamente - Tacômetro em linha	- Baixa transferência de calor entre a camisa do tanque e o meio - Parada do processo	8	2	3	2	32	48	- Testar o agitador com agua antes de começar o processo
2		Menos	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto - Agitador colocado em posição incorreta		- Baixa eficiência de mistura - Bloqueio da tubulação flexível de alimentação do homogeneizador - Ver Nó 3 - Bombeamento Peristáltico	8	3	4	2	48	64	- Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no equipamento) - Aplicar procedimentos de validação
3		Mais	- Falha no controlador do equipamento	- O equipamento é validado periodicamente - Sensor de nível	- Formação de espuma - Redução da eficiência de ruptura - Perda de produto	8	2	3	2	32	48	- Estabelecer programa de manutenção

Nó 5 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Válvulas de alimentação das utilidades estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Baixa vazão de vapor industrial - O vapor não cumpre os parametros de operação	- Tacômetro em linha - Sensores de temperatura -Monitoramento e controle da oper no painel (IHM)	- Incremento do tempo de aquecimento para esterilização - Falha na esterilização - Descumprimento regulatório	9	3	4	2	54	72	- Estabelecer procedimentos de verificação dos parâmetros das utilidades em conjunto com a área responsável pela geração - Aplicar procedimentos de validação
2		Mais	- A agua de resfriamento não cumpre os parametros de operação - Baixa vazão de água de resfriamento		- Incremento do tempo de resfriamento do produto	4	3	4	2	24	32	- Estabelecer programa de manutenção

Equipamento: Freezers

Nó 6 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPR_o	NPR_a	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- Problema mecânico - Falha elétrica - Falha na vedação do equipamento - Vazamento do gás refrigerante	- Registrador de temperatura - O sistema possui alarme visual e sonoro	- Corpos de inclusão fora dos parâmetros de processo - Possível descarte do produto	9	3	4	2	54	72	- Monitorar ao longo do processo a temperatura no registrador - Estabelecer programas de treinamento - O equipamento deve de ser ligado a uma unidade de backup elétrico

Relatório de Análise de Riscos - 5

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos FIOCRUZ	ETAPA	Equipamentos envolvidos	Data:
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química **Universidade do Estado do Rio de Janeiro**	Centrifugação e Lavagem dos Corpos de Inclusão	Centrifuga Tubular de Fluxo Contínuo, Bomba Peristáltica, Tanques - Reatores, Módulo de recuperação de Aerossóis, Fluxo Laminar	2018
Elaborado por: Miguel Angel de la O Herrera	**Operações Unitárias: Centrifugação, Bombeamento, Transferência de Calor, Agitação, Filtração**		
	Descrição: Etapa destinada à recuperação e lavagem dos corpos de inclusão (proteínas de interesse)		

Equipamento: Centrífuga Tubular de Fluxo Continuo

Nó 1 - Centrifugação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Tempo (residência dos sólidos no rotor)	Menos	- A velocidade do fluxo volumétrico é muito elevada - O volume do liquido dentro do rotor é baixo	- Medidor de nivel no tanque de colheita	Baixa recuperação de sólidos Perda de produto	7	4	5	6	168	210	- Estabelecer protocolos de medição de D.O - Avaliar a necessidade de repetir a centrifugação
2		Mais	- Baixa velocidade de fluxo volumétrico dentro do equipamento		- Sólidos recuperados com baixo conteúdo de humidade - Dificultade para ressuspensão de solidos	3	4	5	6	72	90	- Durante os lotes de engenharia deverá de ser determinada vazão ótima
3	Vazão	Não	- Não existe produto na entrada do equipamento - Rompimento da tubulação de entrada	- Medidor de nivel no tanque de colheita	A operação deve ser interrompida Perda de produto Contaminação da área de operação	8	2	3	6	96	144	- Verificação visual da tubulação de transferência
4		Menos	- O cultivo é transferido desde o tanque de colheita a uma vazão fora dos parâmetros do processo - Tubulação rompida - Vazamentos na conexão entre sistemas		Sólidos com baixo conteúdo de humidade	3	4	5	6	72	90	- Durante os lotes de engenharia deverá de ser determinada vazão ótima
5		Mais	- O cultivo é transferido desde o tanque de colheita a uma vazão fora dos parâmetros do processo		- Baixa recuperação de sólidos - Perda de produto	7	4	5	6	168	210	- Estabelecer protocolos de medição de D.O
6	Nível (Sólidos)	Menos	- A proteína foi dissolvida no líquido por alta pressão durante ruptura - A vazão é muito elevada	- Controle em processo para determinação de concentração de proteínas - Medidor de nivel no tanque de colheita	Baixa recuperação de sólidos Perda de produto	6	4	5	6	144	180	- Estabelecer protocolos de medição de D.O - Avaliar a necessidade de repetir a centrifugação

Nó 2 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Mais	- A temperatura de fluido frio é superior à necessária - Baixa pressão do liquido para resfriamento	- Sensor de temperatura - Manómetro	- Superaquecimento no equipamento - Descaracterização dos corpos de inclusão - Perda de produto - Interrupção da operação	9	3	4	3	81	108	- Aplicar procedimentos de verificação de fornecimento de utilidades - Estabelecer programas de treinamento

Equipamento: Tanques de Processo

Nó 3 - Agitação

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Velocidade	Não	- Falha no funcionamento do motor	- O equipamento é validado periodicamente - Tacômetro em linha	- Baixa transferência de calor entre a camisa do tanque e o meio	8	2	3	2	32	48	- Testar o agitador com agua antes de começar o processo
2		Menos	- Falha no controlador do equipamento - Parâmetro de velocidade incorreto - Agitador colocado em posição incorreta		- A Limpeza e Higienização do equipamento pode ser ineficiente - Descumprimento regulatório	8	3	4	2	48	64	- Aumentar a velocidade de agitação (unicamente se não foi detectado defeito no - Aplicar procedimentos de validação
3		Mais	- Falha no controlador do equipamento	- O equipamento é validado periodicamente - Sensor de nível - Tacômetro em linha	- Formação de espuma	8	2	3	2	32	48	- Aplicar procedimentos de validação - Estabelecer programa de manutenção

Nó 4 - Transferência de Calor

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Temperatura	Menos	- Válvulas de alimentação das utilidades estão parcialmente bloqueadas/fechadas - Baixa vazão de vapor industrial - O vapor não cumpre os parametros de operação	- Tacômetro em linha - Sensores de temperatura -Monitoramento e controle da oper no painel (IHM)	- Incremento do tempo de aquecimento para esterilização - Falha na esterilização - Descumprimento regulatório	9	3	4	2	54	72	- Estabelecer procedimentos de verificação dos parâmetros das utilidades em conjunto com a área responsável pela geração - Aplicar procedimentos de validação
2		Mais	- A agua de resfriamento não cumpre os parametros de operação - Baixa vazão de água de resfriamento		- Incremento do tempo de resfriamento do produto	4	3	4	2	24	32	- Estabelecer programa de manutenção

Equipamento: Bombas peristálticas

Nó 5 - Bombeamento Peristáltico

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Volume (liquido no flexível)	Não	- Não existe produto derivado da etapa anterior - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo inspeção visual	- A operação deve ser interrompida - Contaminação da área de operação	8	2	3	6	96	144	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo
2		Menos	- Bolhas de ar na tubulação flexível - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída		- Contaminação da área de operação - A operação deve ser interrompida	6	4	5	6	144	180	
3	Rotação (Roletes)	Menos	- Colocação errada da tubulação flexível - Problemas mecânicos no motor	- Medidor de vazão na etapa anterior (centrífuga)	- Aumento do esforço dos rolos - É possível que a centrifuga não tenha a força necessária para transferir o sobrenadante ao tanque de colheita, retorno de liquido na centrifuga - A operação deve ser interrompida	6	2	3	6	72	108	- Estabelecer programas de treinamento - Estabelecer programa de manutenção preventiva
4		Mais	- Problemas mecânicos no motor - Falha do inversor de frequência	- Medidor de vazão na etapa posterior (tanque de inativação)	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor	7	2	3	6	84	126	
5	Vazão	Não	- Não existe produto derivado da etapa anterior - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito	- A tubulação flexível é semitransparente permitindo - O equipamento é validado antes da operação	- A operação deve ser interrompida	8	2	3	3	48	72	- Estabelecer procedimentos de verificação visual continua ao longo do processo - Estabelecer programas de treinamento - Monitoramento da vazão no tanque de inativação do cultivo - Estabelecer procedimento de parada de emergência
6		Menos	Ver ponto 2 - Tubulação flexível rompida - Tubulação flexível obstruída - Equipamento com defeito (RPM baixo)		- É possível que a centrifuga não tenha a força necessária para transferir o sobrenadante ao tanque de colheita, retorno de liquido na centrifuga	6	4	5	3	72	90	
7		Mais	- Equipamento com defeito (RPM alto)	- O equipamento é validado antes da operação	- Avaria do equipamento por aumento de esforço do motor - A operação deve ser interrompida	7	2	3	3	42	63	

Equipamento: Fluxo Laminar

Nó 6 - Filtração

ID	Parâmetro	Desvio	Causas	Controles	Efeitos	S	Fo	Fa	D	NPRo	NPRa	Recomendações / Observações
1	Vazão (Ar)	Não	- Filtro HEPA saturado - O motor do ventilador não funciona	- Equipamento qualificado e verificado antes da operação - Teste de integridade do filtro	- Não há recuperação de particulas geradas durante a centrifugação - Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias	8	3	4	6	144	192	- Estabelecer procedimentos de inspeção visual dos filtros prévios à operação - Estabelecer limites de saturação do filtro
2		Menos	- Falha no motor do ventilador - Filtro HEPA parcialmente saturado		- Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias	6	4	5	6	144	180	
3		Mais	- O filtro HEPA não foi instalado ou está rompido		- Desvios na classificação da área - Não conformidades regulatorias - Não há recuperação de particulas geradas durante a centrifugação	8	4	5	6	192	240	

ANEXO B – Equações das operações unitárias comumente utilizadas em processos biotecnológicos.

Tabela 31 - Equações para o cálculo da velocidade radial e tangencial para um sistema de agitação.

ID	Equação	Variáveis	
Velocidade Tangencial	$V'_{u2} = ku_2 = k\pi D_a n$	k	Fração da velocidade no extremo da pá
		u_2	Velocidade nos extemos das pás
		D_a	Diâmetro do impelidor
		N	Frequência
Vazão Volumétrica	$q = K\pi^2 D_a^2 nW(1-k)tan\beta'_2$	K	Constante de ajuste de velocidade
		W	Largura da pá
		D_a	Diâmetro do impelidor
		N	Frequência (maiúsculo ou minúsculo?)
		β'_2	Ângulo entre o vetor da velocidade relativa do líquido e a tangente
Velocidade radial	$V'_{r2} = \pi D_a n(1-k)tan\beta'_2$	D_a	Diâmetro do impelidor
		n	Velocidade de giro
		k	Fração da velocidade no extremo da pá
		β'_2	Ângulo entre o vetor da velocidade relativa do líquido e a tangente

Fonte: McCABE et al., 2005.

Tabela 32 - Cálculo da vazão de uma bomba peristáltica.

ID	Equação	Variáveis	
Vazão da bomba peristáltica	$Q_t = V * L * N * RPM$	V	Volume de líquido dentro da tubulação
		L	Comprimento da tubulação dentro dos rolos da bomba
		N	Número de rolos no rotor
		RPM	Revoluções por minuto utilizados na bomba

Fonte: McCABE et al., 2005.

Tabela 33 – Cálculo da transferência de calor em tanques encamisados com um agitador convencional.

ID	Equação	Variáveis	
T. C.	$\frac{h_j D_t}{k} = 0{,}76\left(\frac{D_a^2 n\rho}{\mu}\right)^{\frac{2}{3}}\left(\frac{c_p\mu}{k}\right)^{\frac{1}{3}}\left(\frac{\mu}{\mu_w}\right)^{0{,}24}$	h_j	Coef. de trans.na parede interna da camisa
		k	Condutividade térmica
		D_t	Diâmetro do tanque agitado
		D_a	Diâmetro do agitador
		n	Velocidade do agitador
		ρ	Densidade do líquido
		μ	Viscosidade absoluta

c_p	Calor especifico a pressão constante
μ_w	Viscosidade na temperatura da superfície

Fonte: McCABE et al., 2005.

Tabela 34 - Cálculo do coeficiente de transferência de calor interno (h_i) na condensação no interior de tubos na horizontal que determinada o vapor a alta velocidade.

ID	Equação	Variáveis	
Coeficiente de transferência de calor interno (alta velocidade de vapor)	$\frac{h_i D_{si}}{k_l} = 0{,}026(Pr_l)^{\frac{1}{3}}\left[Re_l + Re_v\left(\frac{\rho_l}{\rho_v}\right)^{\frac{1}{2}}\right]^{0.8}$ *Onde:* $Re_l = \frac{4\dot{m}_l}{\pi D_{si}\mu_l}$ e $Re_v = \frac{4\dot{m}_v}{\pi D_{si}\mu_v}$	h_i	Coeficiente de transferência de calor interno
		D_{si}	Diâmetro interno do tubo
		Pr	Número de Prandtl
		Re_l	Números adimensionais de
		Re_v	Reynolds para liquido e vapor
		ρ_l	Densidade do líquido
		ρ_v	Densidade do vapor
		$\dot{m}_l$	Vazão de liquido condensado
			Vazão de vapor
		$\dot{m}_v$	Viscosidade dinâmica do líquido
		μ_l	Viscosidade dinâmica do vapor
		μ_v	

Fonte: ROHSENOW, 1973.

Tabela 35 - Determinação da velocidade específica de respiração de um cultivo bacteriano considerando as frações molares de oxigênio.

ID	Equação	Variáveis	
Velocidade específica de respiração	$Q_{O2} = \frac{\Phi_e Y_{Oe} - \Phi_s Y_{Os}}{XV}$	Φ_e	Vazão molar do gás que entra no biorreator
		Φ_e	Vazão molar do gás que sai do biorreator
		Y_{Oe}	Fração molar de oxigênio presente no gás na entrada do biorreator
		Y_{Oe}	Fração molar de oxigênio presente no gás na saída do biorreator
		V	Volume de meio do biorreator
		X	Concentração celular determinada como massa de matéria seca

Fonte: DUNN et al., 2003.

Tabela 36 - Equações para definir o comportamento das partículas no recipiente de centrifugação.

ID	Equação	Variáveis	
Tempo de Residência da partícula no rotor	$t_T = \frac{V}{q_c}$	V	Volume do líquido no recipiente num instante
		q_cC	Velocidade de escoamento correspondente ao diâmetro de corte
Vel. de Escoamento	$q_c = \frac{2Vu_t}{s}$	V	Volume do líquido no recipiente num instante
		u_t	Velocidade de sedimentação
		S	Raio da camada líquida
Vel. de sedimentação	$u_t = \frac{s}{2t_T}$	t_T	Tempo de residência
		S	Raio da camada liquida

Fonte: McCABE et al., 2005.

Tabela 37 - Determinação da eficiência de ruptura após homogeneização

ID	Equação	Variáveis	
Eficiência de ruptura	$\ln\left(\frac{1}{1} - D\right) = (0{,}0149 - 2{,}75x10^{-5}X)N^{0{,}71}P^{1{,}165}$	D	Fração de proteína liberada
		N	Número de passagens
		P	Pressão de homogeneização
		X	Concentração celular

Fonte: MIDDELBERG, 2000.

ANEXO C – Critérios de severidade e frequência utilizados para definição do nível de risco utilizando a metodologia HAZOP.

Tabela 38 - Índices de ocorrência considerando lotes com defeitos, intervalo de tempo, e probabilidade do evento acontecer.

a) Frequência por campanha que representa a porcentagem quantitativa do n° de lotes atingidos por desvios durante a campanha de produção de biomassa recombinante		
Classificação	Campanha (porcentagem de nº de lotes atingidos = x)	
Improvável	x ≤ 1%	
Remoto	1% < x ≤ 3%	
Ocasional	3% < x ≤ 10%	
Provável	10% < x ≤ 25%	
Frequente	25% < x ≤ 50%	
Contínuo	50% < x ≤ 100%	
b) Frequência em que um desvio pode acontecer ao longo de um intervalo de tempo determinado		
Classificação	Intervalo de tempo entre desvios	
Improvável	< 1 vez por ano	
Remoto	1 vez por ano	
Ocasional	1 vez por mês	
Provável	1 vez por semana	
Frequente	Todos os dias	
Continuo	Contínuo	
c) Probabilidade de o evento ocorrer considerando sistemas similares ou experiências prévias		
Classificação	Campanha (porcentagem do evento ocorrer = x)	
Improvável	x ≤ 0,5%	
Remoto	0,5% < x ≤ 2%	
Ocasional	2% < x ≤ 5%	
Provável	5% < x ≤ 25%	
Frequente	25% < x ≤ 50%	
Continuo	50% < x ≤ 100%	

Fonte: GILARDI e GOTTI 2013.

Tabela 39 - Critérios de identificação do impacto da severidade dos desvios considerando dano a operadores, danos à estrutura, impacto ambiental, dano aos clientes, exigência regulatória e dano ao produto.

Classificação			Danos a operadores	Danos à estrutura	Impacto ambiental	Danos aos clientes	Exigência regulatória	Dano ao produto
	1	**Insignificante (facilmente reversível)**	Sem efeito à saúde de trabalhadores e sem afastamento	Sem danos a propriedade	Sem danos ao meio ambiente	Sem danos aos clientes	Não existe descumprimento regulatório	Sem paralisação e sem perda de produto
	2	**Baixa (reversível)**	Poucos danos ao trabalhadores, sem afastamento	Dano pequeno a propriedade, afetando apenas os equipamentos da área	Dano pequeno ao meio ambiente	Dano imperceptível aos clientes	Não existe descumprimento regulatório	Sem paralisação e com perda insignificante de produto
	3	**Moderada (possibilidade de ser reversível)**	Danos aos trabalhadores e possibilidade de afastamento	Dano moderado a propriedade, afetando os equipamentos, estrutura da área	Dano moderado ao meio ambiente	Impacto moderado aos clientes	Existem não conformidades	Breve paralisação e perda parcial de produto
	4	**Crítica (possibilidade de não ser reversível)**	Invalidez e possibilidade de morte do trabalhador	Dano significativo a propriedade, afetando as áreas do entorno ao evento	Dano significativo ao meio ambiente	Danos significativos aos clientes	Descumprimento regulatório e não conformidades	Paralização prolongada e grande quantidade de perda de produto
	5	**Catastrófica (não reversível)**	Morte de trabalhadores ao redor da área do evento	Destruição da propriedade, afetando todas as unidades	Dano ao meio ambiente	Morte dos clientes	Descumprimento de vários quesitos regulatórios	Paralização total irreversível e perda total de produto

Fonte: O autor, 2014.