

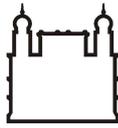
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO  
CONTEÚDO DE POLISSACARÍDEO NA VACINA *Haemophilus  
influenzae* b (conjugada) POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE  
ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA ANIÔNICA**

**ANELYSE DE CARVALHO LIRA SANTOS**

**Rio de Janeiro**

**2013**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
**Bio-Manguinhos**

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

**ANELYSE DE CARVALHO LIRA SANTOS**

**Otimização e validação do método de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) por cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica**

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

**RIO DE JANEIRO**  
**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S237 Santos, Anelyse de Carvalho Lira

Otimização e validação do método de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) por cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica / Anelyse de Carvalho Lira Santos – Rio de Janeiro, 2013.

xvii, 98 f.: il.; 30 cm

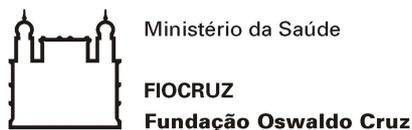
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013.

Bibliografia: f. 74-78

1. *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). 2. Vacinas conjugadas. 3. Controle de Qualidade. 4. Troca aniônica. I. Título.

CDD 615.372

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação do Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert.



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

**ANELYSE DE CARVALHO LIRA SANTOS**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO  
CONTEÚDO DE POLISSACARÍDEO NA VACINA *Haemophilus  
influenzae b* (conjugada) POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE  
ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA ANIÔNICA**

Orientador: Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert

Dissertação aprovada em 23 de maio de 2013

Examinadores:

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva (Presidente)

Fiocruz

Prof. Dra. Bernardete Ferraz Spisso

Fiocruz

Prof. Dra. Rosangela Sabbatini Capella Lopes

UFRJ

RIO DE JANEIRO

2013

À memória da minha avó,  
Cleuza de Carvalho Lira, por  
quem eu sempre tive e sempre  
terei muito amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, porque Dele, por Ele e para Ele, são todas as coisas. Toda honra, glória e louvor sejam dados Àquele que me deu forças para chegar até aqui.

À Fiocruz e a Bio-Manguinhos por oferecerem o Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos e toda a estrutura necessária à realização do trabalho.

A Darcy Akemi Hokama, Ana Lúcia Palmigiani e Eliene Cabral Raposo pela permissão para fazer o mestrado e por compreenderem as ausências.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert por sua dedicação, paciência e apoio ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo carinho, atenção e amor, e, principalmente, pelo zelo que sempre tiveram pela minha educação.

À minha irmã Giovanna pela paciência e pelo apoio emocional.

À minha família, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos colegas do MPTI 2011 pelo companheirismo e por todos os momentos de alegria que passamos juntos, principalmente a minha companheira de mesa Ana Paula Fernandes Leal.

Aos amigos do LAFIQ, em especial ao SEMPR, pelo importante apoio durante estes dois anos.

À amiga Joyce Brito de Carvalho Coelho por todo o incentivo e ajuda, tanto profissionalmente, desde a prova de seleção para o Mestrado, quanto na vida pessoal.

À amiga Jéssica Yukie Nagashima, por sua amizade e zelo por mim, desde os tempos de faculdade.

Aos amigos Ana Cláudia Bergamo, Arthur Amorim, Cláudio Figueira, Gláucia Motta, Eduardo da Silva Gomes de Castro, Lauro de Sena Laurentino, por todo o apoio, incentivo, ajuda nos experimentos e por estarem sempre lá quando precisei.

À Mabel e Renato Simões por suas palavras de força e incentivo.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta dissertação tornar-se realidade, o meu MUITO OBRIGADA.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 O MICRORGANISMO <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib).....	1
1.1.1 Patogênese .....	2
1.1.2 Cápsula polissacarídica.....	4
1.2 AS VACINAS CONTRA <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	5
1.2.1 Desenvolvimento de uma vacina contra Hib .....	5
1.2.2 Vacinas polissacarídicas .....	5
1.2.3 Vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína .....	6
1.3 PRODUÇÃO DA VACINA <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada) NO BRASIL ...	7
1.4 A IMPORTÂNCIA DA VACINAÇÃO E DE UM CONTROLE DE QUALIDADE EFETIVO DAS VACINAS .....	10
1.6 A QUÍMICA ANALÍTICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS.....	11
1.7 INTRODUÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA ANIÔNICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS CONJUGADAS.....	12
1.8 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA IÔNICA .	14
1.8.1 Considerações gerais.....	14
1.8.2 Princípios básicos da técnica .....	14
1.8.3 Instrumentação.....	15
1.8.4 Vantagens e desvantagens.....	17
1.8.5 Aplicações .....	17
1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	18
1.9.1 Seletividade.....	20

1.9.2 Linearidade.....	21
1.9.3 Intervalo.....	21
1.9.4 Precisão .....	21
1.9.4.1 Repetitividade.....	22
1.9.4.2 Precisão intermediária.....	22
1.9.4.3 Reprodutibilidade .....	23
1.9.5 Limite de detecção .....	23
1.9.6 Limite de quantificação.....	24
1.9.7 Exatidão .....	25
1.9.8 Robustez .....	26
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 AMOSTRAS DE TRABALHO E PADRÃO.....	28
3.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UTILIZADO .....	29
3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO .....	29
3.3.1 <i>Waveform</i> .....	29
3.3.1.1 Preparo da fase móvel .....	30
3.3.1.2 Preparo da curva analítica.....	30
3.3.1.3 Preparo da amostra.....	31
3.3.1.4 Parâmetros cromatográficos .....	31
3.3.2 Tempo de retenção .....	31
3.3.3 Hidrólise alcalina .....	32
3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO .....	32
3.4.1 Seletividade.....	32
3.4.2 Linearidade.....	33
3.4.3 Intervalo.....	34
3.4.4 Precisão .....	34
3.4.4.1 Repetitividade (precisão intra-corrída).....	35
3.4.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) .....	35
3.4.5 Limites de detecção e quantificação .....	35
3.4.6 Exatidão .....	35

3.4.7 Robustez .....	36
3.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO SINAL QUANTIFICADOR .....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>37</b>
4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO .....	37
4.1.1 <i>Waveform</i> .....	37
4.1.2 Tempo de retenção .....	47
4.1.3 Hidrólise alcalina .....	52
4.1.4 Método otimizado .....	54
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO .....	54
4.2.1 Seletividade .....	55
4.2.2 Linearidade .....	59
4.2.3 Intervalo .....	60
4.2.4 Precisão .....	61
4.2.4.1 Repetitividade (precisão intra-corrída) .....	61
4.2.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) .....	61
4.2.5 Limites de detecção e quantificação .....	63
4.2.6 Exatidão .....	63
4.2.7 Robustez .....	64
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO SINAL QUANTIFICADOR .....	65
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CMD	Concentração média determinada
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
CV	Coeficiente de variação
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DP	Desvio-padrão
DP <sub>a</sub>	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GSK	GlaxoSmithKline
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HPAE-PAD	<i>High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i> - Cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica com detecção amperométrica pulsada
IC	Inclinação da curva analítica
IT	Instrução de trabalho
LAFIQ	Laboratório Físico-Químico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MHCII	Complexo de histocompatibilidade de classe II
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MR	Material de referência
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PMT	Proteína monomérica tetânica
p/p	Peso por peso
p/V	Peso por volume

PNI	Programa Nacional de Imunização
PRP	Poliribosil-ribitol-fosfato
r	Coeficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Desvio padrão relativo
TD	Toxóide diftérico
Tecpar	Instituto de Tecnologia do Paraná
TT	Toxóide tetânico
UV	Ultravioleta
V <sub>o</sub>	Volume morto

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Micrografia eletrônica de varredura da bactéria <i>Haemophilus influenzae</i> (haste azul) colonizando o epitélio nasal humano .....	2
<b>Figura 1.2</b>	Estrutura química da cápsula polissacarídica de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b .....	4
<b>Figura 1.3</b>	Esquema da vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada), composta de PRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico .....	7
<b>Figura 1.4</b>	Fluxograma das etapas de produção da vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada) .....	9
<b>Figura 1.5</b>	Componentes da instrumentação da cromatografia iônica .....	15
<b>Figura 4.1</b>	À esquerda, representação esquemática da <i>waveform</i> B. À direita, a tabela apresenta seus respectivos parâmetros .....	37
<b>Figura 4.2</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido em uma análise de rotina com a <i>waveform</i> B realizada em 18/06/2012, onde se pode observar o alto ruído na linha de base provocado pelo desgaste do eletrodo .....	38
<b>Figura 4.3</b>	À esquerda, representação esquemática da <i>waveform</i> A. À direita, a tabela apresenta seus respectivos parâmetros .....	39
<b>Figura 4.4</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a <i>waveform</i> B .....	40
<b>Figura 4.5</b>	Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a <i>waveform</i> B. O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse .....	40
<b>Figura 4.6</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a <i>waveform</i> A .....	41
<b>Figura 4.7</b>	Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a <i>waveform</i> A. O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse .....	41

<b>Figura 4.8</b>	Comparação das curvas analíticas obtidas com a <i>waveform</i> B e com a <i>waveform</i> A .....	44
<b>Figura 4.9</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase I (100 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio) .....	48
<b>Figura 4.10</b>	Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase I (100 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse .....	49
<b>Figura 4.11</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase II (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio) .....	49
<b>Figura 4.12</b>	Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase II (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse .....	50
<b>Figura 4.13</b>	Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase III (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 0,7 mol/L de hidróxido de sódio) .....	50
<b>Figura 4.14</b>	Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase III (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 0,7 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse .....	51
<b>Figura 4.15</b>	Variação das áreas dos picos cromatográficos referentes ao padrão de 10 µg/mL de PRP em função do tempo de hidrólise alcalina .....	53
<b>Figura 4.16</b>	Variação das áreas dos picos cromatográficos referentes à amostra de vacina em função do tempo de hidrólise alcalina .....	53
<b>Figura 4.17</b>	Visão geral do cromatograma de uma amostra de vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada). No detalhe, a escala do cromatograma foi modificada para melhor visualização do pico de interesse .....	55
<b>Figura 4.18</b>	Cromatogramas representativos do estudo da seletividade: (a) água, (b) água com adição de solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L e (c) lactose com adição de solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L .....	56

<b>Figura 4.19</b>	Cromatogramas sobrepostos da solução de PMT tratada com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L (—), adicionada a uma amostra de vacina (—) e, uma amostra de vacina como controle (—). Acima, visão geral; abaixo, escala modificada para melhor visualização do pico de interesse .....	57
<b>Figura 4.20</b>	Cromatogramas sobrepostos da solução de material de referência de PRP tratada com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L (—), adicionada a uma amostra de vacina (—) e, uma amostra de vacina como controle (—). Acima, visão geral; abaixo, escala modificada para melhor visualização do pico de interesse .....	58
<b>Figura 4.21</b>	Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva A .....	59
<b>Figura 4.22</b>	Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva B .....	59
<b>Figura 4.23</b>	Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva C .....	59
<b>Figura 4.24</b>	Unidade de PRP .....	65
<b>Figura 4.25</b>	Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray -5 volts RF 150 volts. Fase móvel: solução 10 mmol/L de acetato de amônio .....	66
<b>Figura 4.26</b>	Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray -5 volts RF 150 volts. Fase móvel: água deionizada .....	67
<b>Figura 4.27</b>	Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray -80 volts RF 150 volts. Fase móvel: solução 10 mmol/L de acetato de amônio.....	67
<b>Figura 4.28</b>	Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray -80 volts RF 150 volts. Fase móvel: água deionizada .....	68
<b>Figura 4.29</b>	Previsão de clivagem do monômero .....	68
<b>Figura 4.30</b>	Regeneração do fosfato para a forma de fosfato trissódico .....	69
<b>Figura 4.31</b>	Clivagem na ponte com oxigênio e liberação do ribitol da estrutura ...	69
<b>Figura 4.32</b>	Formação de insaturação .....	70
<b>Figura 4.33</b>	Espectro UV do sinal do cromatograma CLAE-DAP purificado .....	70
<b>Figura 4.34</b>	Elucidação estrutural .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b>	Classificação dos testes, segundo sua finalidade .....	19
<b>Tabela 1.2</b>	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade .....	19
<b>Tabela 3.1</b>	Preparo dos pontos da curva analítica .....	30
<b>Tabela 3.2</b>	Concentração dos componentes da fase móvel do método não otimizado e suas subsequentes modificações .....	31
<b>Tabela 3.3</b>	Componentes utilizados para avaliação de seletividade do método e seus respectivos modo de preparo .....	33
<b>Tabela 3.4</b>	Preparo dos pontos da curva analítica para a avaliação da linearidade do método .....	34
<b>Tabela 4.1</b>	Tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as <i>waveforms</i> B e A .....	42
<b>Tabela 4.2</b>	Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias dos tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as <i>waveforms</i> B e A .....	42
<b>Tabela 4.3</b>	Teste t, assumindo variâncias diferentes dos tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as <i>waveforms</i> B e A .....	43
<b>Tabela 4.4</b>	Valores corrigidos dos pontos da curva analítica, baseados na concentração nominal descrita no certificado do material de referência de PRP .....	44
<b>Tabela 4.5</b>	Resultados da concentração de PRP na amostra de vacina, lote 084VZF011Z, determinados em função das curvas analíticas obtidas com as <i>waveforms</i> B e A .....	45
<b>Tabela 4.6</b>	Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias das concentrações determinadas em função das curvas analíticas obtidas com as <i>waveforms</i> B e A .....	46

<b>Tabela 4.7</b>	Teste t, assumindo variâncias equivalentes para os resultados obtidos com as curvas analíticas das <i>waveforms</i> B e A .....	47
<b>Tabela 4.8</b>	Médias dos tempos de retenção obtidos nas análises realizadas com as modificações da concentração de acetato de sódio e de hidróxido de sódio na fase móvel .....	51
<b>Tabela 4.9</b>	Média, desvio padrão e coeficiente de variação das áreas obtidas nas análises do padrão e de uma amostra de vacina, hidrolisados com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L, após 36 minutos transcorridos da hidrólise .....	54
<b>Tabela 4.10</b>	Parâmetros antes e após a otimização do método .....	54
<b>Tabela 4.11</b>	Resultados do ensaio de repetitividade realizado pelo analista 1 .....	61
<b>Tabela 4.12</b>	Resultados dos ensaios de precisão intermediária realizados pelos analistas 1 e 2 .....	62
<b>Tabela 4.13</b>	Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos pelos analistas 1 e 2 para o ensaio de precisão intermediária .....	62
<b>Tabela 4.14</b>	Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias das concentrações determinadas em função das curvas analíticas obtidas pelos analistas 1 e 2 .....	62
<b>Tabela 4.15</b>	Teste t, assumindo variâncias equivalentes para os resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, com 5 % de significância .....	63
<b>Tabela 4.16</b>	Resultados do ensaio de recuperação realizado em quatro amostras independentes de vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada) .....	64

## RESUMO

*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é uma bactéria patogênica responsável por causar pneumonia e meningite, principalmente em crianças menores de cinco anos. A doença causada por Hib pode ser prevenida através da imunização da população com a vacina conjugada polissacarídeo-proteína, cuja eficácia depende do principal fator de virulência da bactéria: a cápsula polissacarídica. Assim, para garantir a imunogenicidade da vacina, é importante o controle do conteúdo de polissacarídeo presente no produto final. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar o método analítico, desenvolvido pelo Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina conjugada de Hib, empregando a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica com detecção amperométrica pulsada. O método cromatográfico foi otimizado quanto à retenção e resolução adequadas. A mudança na *waveform* de trabalho promoveu maior sensibilidade, reprodutibilidade e menos desgaste do eletrodo de trabalho. A alteração da composição da fase móvel permitiu boa separação, com alta sensibilidade, reduzindo o tempo de corrida de 17 para 12 minutos. O tempo necessário para o pré-tratamento das amostras (hidrólise alcalina) foi reduzido de 7 horas para 40 minutos. Os parâmetros cromatográficos estabelecidos na otimização do método foram: coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm) precedida por pré-colunas AminoTrap (3 x 30 mm) e BorateTrap (4 x 50 mm), da Dionex Corporation. Foi empregado um fluxo de 1 mL/min, com eluição isocrática. A fase móvel foi composta de solução de acetato de sódio 0,2 mmol/L e solução de hidróxido de sódio 0,7 mol/L. O volume de injeção foi de 50 µL. Os parâmetros de adequação do sistema da nova metodologia estão em conformidade com os preconizados nos compêndios oficiais no que concerne à validação de metodologias analíticas. O método demonstrou boa seletividade, bem como apresentou linearidade ao longo do intervalo de medição estudado, com limites de detecção e quantificação iguais a, respectivamente, 0,56 µg/mL e 1,66 µg/mL. A precisão do método pode ser considerada satisfatória, em termos dos coeficientes de variação obtidos, inferiores a 5 %, conforme preconiza a ANVISA. Não foi evidenciada diferença significativa entre os resultados apresentados por analistas diferentes em dias diferentes. A recuperação média obtida foi de (100 ± 2) %, demonstrando que o método apresenta exatidão adequada. Com relação à robustez, foi constatada a susceptibilidade do método a variações no pH da fase móvel e ao tempo de hidrólise. A validação do método produziu dados adequados para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos obtidos e para o emprego da metodologia proposta no controle de qualidade do produto final, realizado pelo Laboratório Físico-Químico, do Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos.

## ABSTRACT

*Haemophilus influenzae* type b (Hib) is a pathogenic bacterium responsible for causing pneumonia and meningitis, especially in children aged less than 5 years. The disease caused by Hib can be prevented by immunization of the population with the polysaccharide-protein conjugate vaccine, whose effectiveness depends on the major virulence factor of the bacterium: a polysaccharide capsule. Thus, to ensure vaccine immunogenicity, it is important to control the content of polysaccharide present in the final product. The aim of this study was to optimize and validate the analytical method, developed by the Quality Control Department of Bio-Manguinhos, in order to determine the content of the polysaccharide in the conjugate vaccine of Hib, using the technique of liquid chromatography high performance anion exchange with pulsed amperometric detection. The chromatographic method was optimized for retention and appropriate resolution. The change in working waveform promoted greater sensitivity, reproducibility and less wear on the working electrode. The changing composition of the mobile phase enabled good separation with high sensitivity, reducing the running time from 17 to 12 minutes. The time required for the pretreatment of samples (alkaline hydrolysis) was reduced from 7 hours to 40 minutes. The chromatographic parameters established in the optimized method were CarboPac PA10 (4 x 250 mm) analytical column, preceded by AminoTrap (3 x 30 mm) and BorateTrap (4 x 50 mm) pre-columns, from Dionex Corporation. A flow rate of 1 mL/min with isocratic elution was employed. The mobile phase consisted of 0.2 mmol/L sodium acetate solution and 0.7 mol/L sodium hydroxide solution. The injection volume was 50  $\mu$ L. System suitability parameters of the new methodology are in line with those recommended in the official compendia concerning validation of analytical methodologies. The method has shown good selectivity as well, showed linearity over the studied measuring interval, with limits of detection and quantification equal to, respectively, 0,56  $\mu$ g/mL and 1,66  $\mu$ g/mL. Method accuracy can be considered satisfactory in terms of coefficient of variation obtained, lower than 5 %, as required by ANVISA. There was no significant difference between results reported by different analysts, on different days. Average recovery was (100  $\pm$  2) %, demonstrating that the method has adequate accuracy. In relation to robustness, the method was found susceptible to pH of the mobile phase variations and to hydrolysis time. The method validation yielded adequate results to ensure reliability of the analytical results and the employment of the proposed methodology in quality control of the final product, conducted by the Physicochemical Laboratory from the Department of Quality Control of Bio-Manguinhos.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O MICRORGANISMO *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)

O gênero *Haemophilus* compreende seres procariotos, gram-negativos, pertencentes à família *Pasteutelleaceae* (Ayub e Pinto 1994, Carvalho e Andrade 2006). São descritas nove espécies de *Haemophilus* que podem estar associadas aos humanos: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. paraphrophaemolyticus*, *H. segnis* e *H. ducreyi*. As espécies de *Haemophilus* estão frequentemente associadas ao trato respiratório, com exceção da espécie *H. ducreyi*, que coloniza o trato genital (Marin e Silva 2005).

A espécie *Haemophilus influenzae* é considerada como a mais importante em relação à infecção em humanos (Almeida 2005), pois coloniza de forma assintomática a nasofaringe de 75 % das crianças e de adultos saudáveis (Marin e Silva 2005). São microrganismos aeróbicos/microaerofílicos, apresentam morfologia coco bacilar, são imóveis e não esporulados (Albani 2008).

Dependendo da estrutura química da camada externa do microrganismo, os *Haemophilus influenzae* podem ser encapsulados ou não encapsulados. Nas linhagens da forma encapsulada, a cápsula da bactéria é constituída de polissacarídeo de alta massa molecular cuja estrutura define o seu sorotipo (Ayub e Pinto 1994). São descritos seis sorotipos, antigenicamente distintos, capsulados de *Haemophilus influenzae*: a, b, c, d, e, f. Dentre os seis, o sorotipo b é o que predomina em amostras obtidas de pacientes, sendo de grande interesse médico (Kelly et al. 2004).

O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) foi descrito pela primeira vez, em 1892, por Richard Pfeiffer e, ainda hoje, é o responsável por 95 % das infecções invasivas (Lorthiois 2007, Medscape 2012), podendo causar diferentes manifestações que variam da infecção assintomática a doenças invasivas graves, com altos índices de mortalidade e morbidade na infância no mundo todo (Bouskela et al. 2000, Bricks 1998).

### 1.1.1 Patogênese

O *Haemophilus influenzae* tipo b é um patógeno restrito de humanos e se encontra, geralmente, associado à flora comensal normal das vias aéreas superiores. Acredita-se que, até a idade de cinco anos, a maioria das crianças já tenha entrado em contato com o patógeno, já que sua transmissão de um portador para outros indivíduos ocorre através de gotículas de saliva ou pelo contato direto (Lorthiois 2007).

O desenvolvimento da doença sistêmica, por Hib, se dá através da aderência do microrganismo nas vias aéreas e posterior colonização do epitélio da nasofaringe do hospedeiro (Figura 1.1). Esta colonização pode ser transiente ou prolongada, com duração de meses sem a detecção dos sintomas. O microrganismo também pode invadir o organismo do hospedeiro, através da disseminação sistêmica (Bouskela et al. 2000, Lorthiois 2007).



**Figura 1.1** Micrografia eletrônica de varredura da bactéria *Haemophilus influenzae* (haste azul) colonizando o epitélio nasal humano. Fonte: Science photo library 2012.

O período de incubação não é conhecido. Os microrganismos colonizadores, após invadirem a mucosa, entram na corrente sanguínea. A presença de anticorpos, do complemento e de fagócitos é o que determinará o desenvolvimento da bacteremia. Uma maior carga bacteriana ou a presença de uma infecção viral, concomitante, pode potencializar a infecção por Hib. Quando a concentração bacteriana atinge um nível crítico, o Hib pode se disseminar para vários locais, incluindo meninges, tecido subcutâneo, articulações, pleura, pericárdio e pulmões (Medscape 2012).

O sorotipo b de *Haemophilus influenzae* acomete, principalmente, crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunossuprimidos. Dentre outras manifestações, o Hib pode provocar meningite, bacteremias, celulite, otite média aguda, septicemia, epiglotite, osteomielite, pneumonia e artrite séptica. Infecções invasivas menos comuns incluem endoftalmite, infecção do trato urinário, abscessos, adenite cervical, osteomielite e endocardite (Kaplan 1988, Kelly et al. 2004, Medscape 2012).

A manifestação mais comum da doença invasiva causada por Hib é a meningite que, no período anterior ao desenvolvimento da vacina, representava de 50 a 65 % dos casos, em países desenvolvidos. A meningite é a infecção das membranas que recobrem o cérebro e pode ocasionar febre, enrijecimento da nuca e a diminuição do estado mental (Lorthiois 2007).

A mortalidade global de meningite, promovida pelo Hib, é de, aproximadamente, 5 %. No entanto, as taxas de morbidade da meningite são elevadas. Até 50 % dos indivíduos com meningite promovida por Hib adquirem sequelas neurológicas, incluindo perda auditiva parcial ou total, atraso no desenvolvimento, atraso e/ou distúrbios de linguagem, distúrbios de comportamento, problemas de visão, retardo mental, problemas motores, ataxia, convulsões e hidrocefalia (Medscape 2012).

Por ser uma doença silenciosa e por não causar um quadro clínico único e específico característico da doença, não é possível obter um diagnóstico rápido e preciso, o que retarda o início do tratamento. A confirmação da presença deste agente infeccioso no organismo humano requer a coleta de sangue ou de fluido cerebrospinal para isolamento e identificação do microrganismo em laboratório. Paralelamente, deve-se dar início ao tratamento com antibióticos, ainda antes da conclusão do diagnóstico (Lorthiois 2007).

Embora muitos casos de infecções promovidas pelo Hib tenham sido relatados, sua patogênese não está completamente esclarecida. Estudos utilizando mutantes genéticos definidos, modelos *in vivo* e *in vitro* vêm sendo realizados, a fim de demonstrar a base molecular do sistema nervoso central infectado por *Haemophilus influenzae* tipo b (Albani 2008, Moxon 1992).

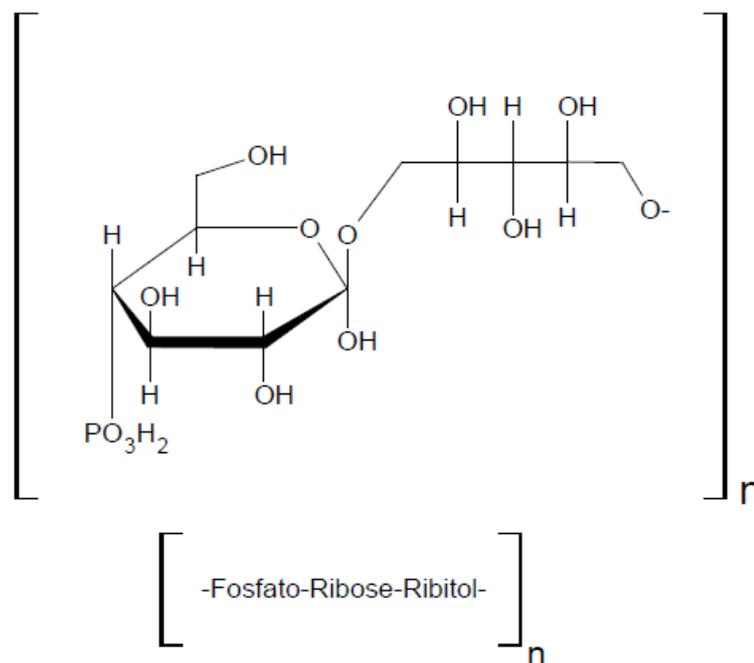
Entretanto, o *Haemophilus influenzae* tipo b apresenta algumas estruturas presentes em sua superfície e secreta algumas substâncias que podem ser determinantes para a patogenicidade do microrganismo. Dentre estas, a cápsula polissacarídica consiste em um importante determinante da habilidade de Hib

atravessar a nasofaringe e, após a bacteremia, se localizar no fluido cérebro-espinhal e nas meninges, além de facilitar a sobrevivência intravascular do microrganismo (Lorthiois 2007, Moxon 1992).

### 1.1.2 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica de *Haemophilus influenzae* é espessa, está firmemente aderida à parede celular e protege a bactéria dos processos de lise e fagocitose (mecanismos ditos não específicos) do organismo hospedeiro (Almeida 2005, Ayub e Pinto 1994).

O sorotipo b é composto de unidades repetitivas de poliribosil-ribitol-fosfato (PRP): um heteropolímero linear quimicamente composto por monômeros contendo unidade de ribose, ribitol e fosfato, unidos por uma ligação fosfodiéster na proporção 1:1:1 (Figura 1.2) (Lorthiois 2007).



**Figura 1.2** Estrutura química da cápsula polissacarídica de *Haemophilus influenzae* tipo b. Fonte: Albani 2008.

O PRP é o antígeno capsular sob o qual a resposta imunológica é dirigida (Ayub e Pinto 1994), sendo capaz de induzir uma resposta imune protetora timo independente ao homem. Esta característica foi explorada pelos cientistas durante o desenvolvimento da primeira geração de vacinas que eram compostas apenas pelo polissacarídeo capsular de Hib (Almeida 2005, Carvalho e Andrade 2006).

## **1.2 AS VACINAS CONTRA *Haemophilus influenzae* tipo b**

### **1.2.1 Desenvolvimento de uma vacina contra Hib**

O advento de agentes antibacterianos, tais como os antibióticos, interromperam por décadas o interesse no desenvolvimento de uma vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b. Contudo, a mortalidade e a morbidade da doença não puderam ser completamente eliminadas com os antibióticos, principalmente por que linhagens resistentes a estes agentes antibacterianos foram surgindo, tornando latente a necessidade de desenvolver uma vacina contra a bactéria em questão (Lorthiois 2007).

No final dos anos 60, pesquisadores começaram, de fato, a tentativa de utilizar o polissacarídeo componente da cápsula da bactéria como imunógeno para a produção da vacina. O objetivo deles era atingir a eliminação da doença, interrompendo sua transmissão e promovendo o desaparecimento do agente causal de determinadas áreas geográficas, o qual só seria atingido com a vacinação (Lorthiois 2007, Martins 2011).

### **1.2.2 Vacinas polissacarídicas**

A primeira geração de vacinas contra bactérias encapsuladas utilizava, como antígeno de maior eficiência para a sua formulação, o próprio polissacarídeo presente na cápsula da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Lorthiois 2007). Schneerson (1971) verificou que a presença do anticorpo obtido contra a cápsula tipo b conferia proteção contra a doença causada por Hib, sugerindo que esses anticorpos, obtidos naturalmente, proporcionavam proteção. Assim, estudos foram realizados na tentativa de induzir imunidade protetora, utilizando o polissacarídeo capsular como antígeno.

Os polissacarídeos capsulares são moléculas grandes que consistem em epítomos repetitivos que não são processados pelas células apresentadoras de antígenos, mas que podem interagir diretamente com moléculas de imunoglobulina da superfície de células B, induzindo síntese de anticorpos na ausência de células T, sendo considerados antígenos timo independentes (Ayub e Pinto 1994, Goldblatt 2000).

Assim, a primeira vacina licenciada contra *H. influenzae* tipo b foi desenvolvida no início dos anos 80, composta, basicamente, pelo seu polissacarídeo purificado, o PRP (Bardotti et al. 2000, Fitzwater et al. 2010). Entretanto, esta vacina só era capaz de induzir resposta imunogênica em um público alvo restrito, composto por crianças acima de cinco anos e adultos. Isso porque as vacinas constituídas pela cápsula bacteriana eram capazes de induzir forte resposta primária de anticorpos, mas com baixa indução de memória imunológica, principalmente em crianças com idade inferior a 18 meses, cujo sistema imunológico se encontra em processo de maturação (Goldblatt 2000, Kelly et al. 2004).

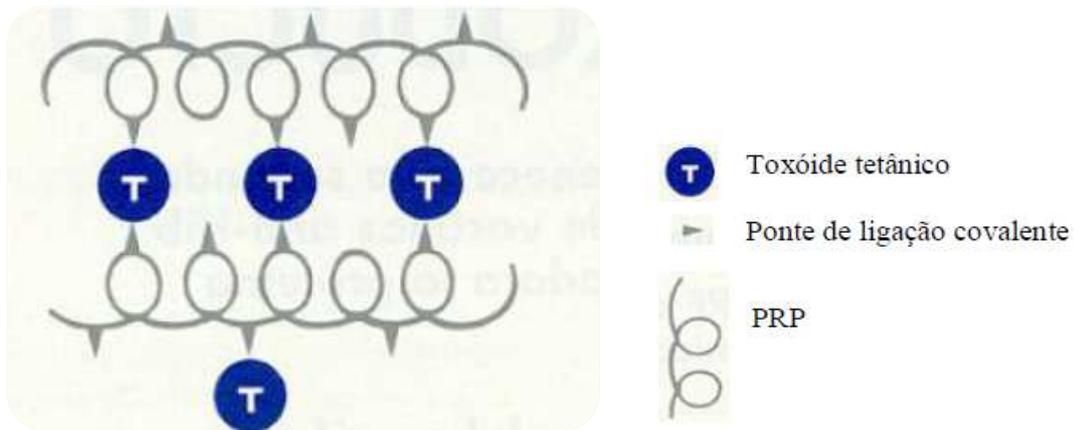
Para contornar as limitações imunológicas das vacinas polissacarídicas, surgiram as vacinas conjugadas, nas quais o PRP é conjugado quimicamente a uma proteína carregadora, a fim de modificar o tipo de apresentação de antígenos e o tipo de resposta imune induzida promovendo, assim, resposta de memória imunológica timo dependente, tornando-se eficaz na faixa etária de maior risco (Kelly et al. 2004).

### **1.2.3 Vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína**

As primeiras vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b foram licenciadas no final da década de 80. No início da década de 90, já eram parte integrante do primeiro estágio de imunização infantil (primeiros meses de vida) de alguns países, conferindo imunidade protetora a curto e em longo prazo, em indivíduos de todas as faixas etárias, incluindo-se o grupo de maior risco – crianças menores de dois anos de idade (Fitzwater et al. 2010, Garner e Weston 2003).

As vacinas conjugadas são obtidas através de uma conjugação química, onde o PRP é covalentemente ligado a uma proteína carregadora (Kelly et al. 2004). A conjugação se dá devido ao polissacarídeo apresentar, em cada subunidade constitutiva, pelo menos um grupo funcional (carboxila ou hidroxila) e a proteína apresentar em sua molécula grupos carboxílicos e amínicos livres (Lorthiois 2007).

Dentre as proteínas carregadoras utilizadas para a produção de vacinas conjugadas estão: o toxóide tetânico (TT), o toxóide diftérico (TD), o mutante da toxina diftérica ou, então, outras proteínas da membrana externa de bactérias (Goldblatt 2000). Na figura 1.3 pode-se observar, esquematicamente, a vacina composta de PRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico.



**Figura 1.3** Esquema da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), composta de PRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico. Fonte: Almeida 2005.

Independente do tipo de carregador proteico, os glicoconjugados formados estimulam o sistema imune através de uma interação inicial do conjugado à superfície de imunoglobulinas de células B com especificidade apropriada para haptenos de origem sacarídica. O glicoconjugado é internalizado e a proteína carregadora é degradada por enzimas proteolíticas. Alguns peptídeos chaves são transportados e apresentados pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHCII). O complexo MHCII-peptídeo é reconhecido pelas células T que então gera sinais apropriados, através de interações diretas com proteínas de superfície celular e através de citocinas, para induzir à maturação de células B e sua diferenciação em células plasmáticas, cuja principal função é a secreção de anticorpos (Lorthiois 2007).

### 1.3 PRODUÇÃO DA VACINA *Haemophilus influenzae* b (conjugada) NO BRASIL

No Brasil, o contágio por Hib constituía a causa mais frequente de meningite na infância, possuindo uma alta incidência, em torno de 0,5 % da população infantil, e grande impacto na mortalidade infantil. Em virtude do seu elevado impacto nas condições de saúde, os organismos internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) sugeriram a introdução da vacina conjugada de Hib na rotina de vacinação infantil em todo país. Entretanto, como os custos para produção da vacina eram elevados (em torno de 2,5 dólares a dose) para sua introdução nos programas de vacinação dos países menos desenvolvidos, no ano de 1999, a vacina Hib começou a ser produzida no Brasil (Bio-Manguinhos 2007, Gadelha e Azevedo 2003).

A implantação da produção da vacina conjugada de Hib no país foi resultado do primeiro acordo de transferência de tecnologia formal entre a empresa Belga GlaxoSmithKline (GSK) e o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pela produção industrial de imunobiológicos. Na época da negociação, a tecnologia era considerada de ponta e apenas dois laboratórios no mundo produziam essa vacina (Alonso 2005, Bio-Manguinhos 2009).

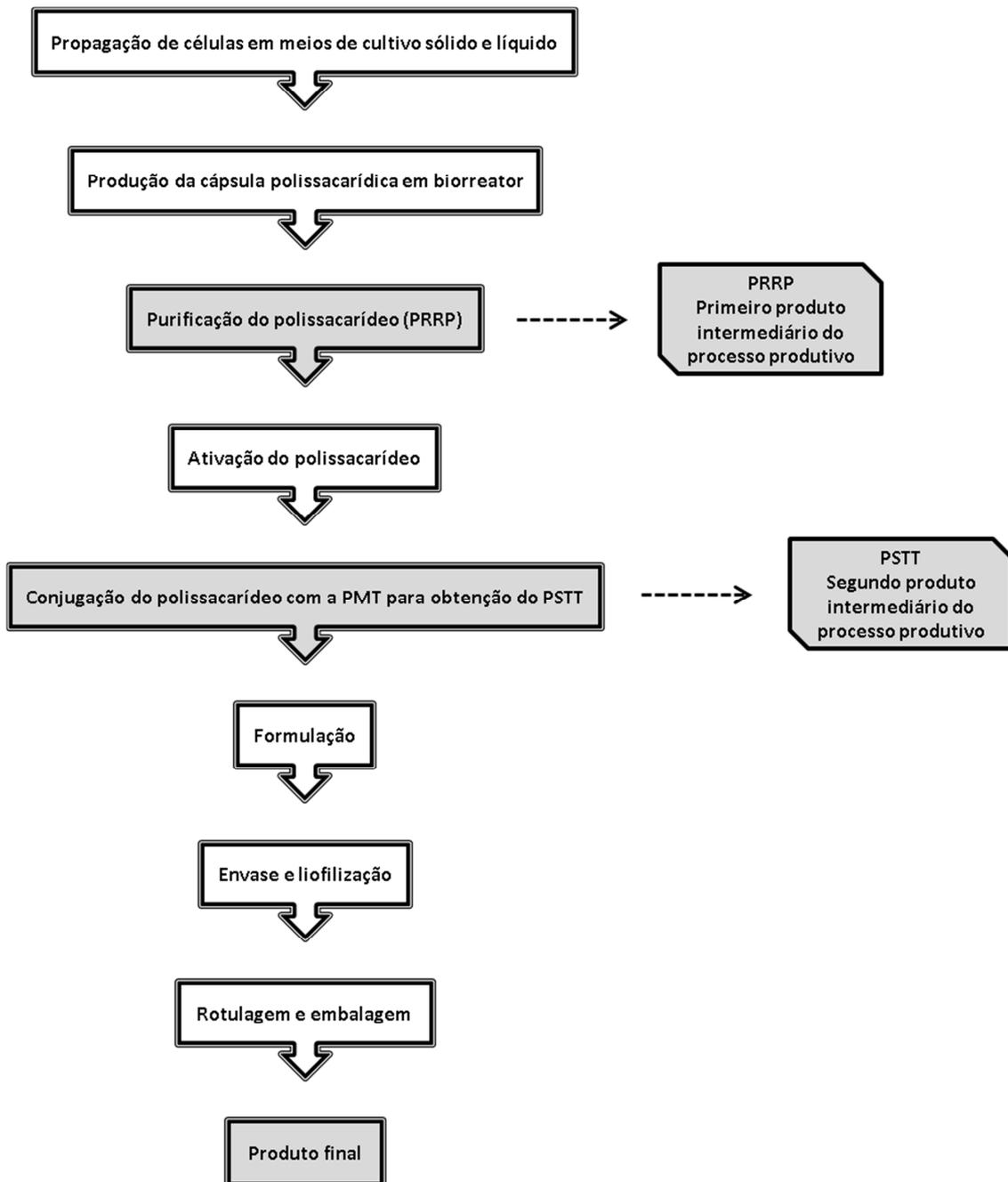
Ao longo de cinco anos, diferentes etapas estiveram envolvidas até a incorporação de todo o ciclo de produção da vacina conjugada de Hib em Bio-Manguinhos. O início da produção da vacina no Instituto tornou necessária a modernização de seu Parque Tecnológico, com fortes investimentos em equipamentos e instalações, assim como o estabelecimento de metodologias de análises padronizadas e validadas (Alonso 2005).

Em 2005, a transferência de tecnologia se concretizou, com a produção nacional de todo ciclo da vacina, trazendo muitos ganhos tecnológicos, tais como (Bio-Manguinhos 2009):

- Produto totalmente nacionalizado;
- Economia de divisas para o Brasil, que não necessita mais importar o imunizante;
- Formação de pessoal técnico altamente especializado;
- Fortalecimento dos laboratórios de controle de qualidade;
- Fortalecimento de todas as atividades envolvidas em apoio operacional e administrativo;
- Desdobramentos tecnológicos para diferentes projetos de Bio-Manguinhos.

Ao final da transferência, três lotes de consistência do produto foram produzidos para utilização em estudos clínicos de não inferioridade, a fim de demonstrar que a vacina produzida no país era similar àquela produzida pela GSK (Bio-Manguinhos 2009). Comprovada a similaridade, já no primeiro ano, todo o esforço empreendido durante a transferência de tecnologia permitiu o envase e a oferta de 7,5 milhões de doses de vacina ao Programa Nacional de Imunização (PNI), atendendo à demanda nacional e permitindo grande economia para o país (Gadelha e Azevedo 2003, Nunes 2009).

Atualmente, Bio-Manguinhos utiliza processos avançados de conjugação química e de bioengenharia para fermentação, purificação e caracterização de macromoléculas para produzir a vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) (Gadelha e Azevedo 2003). As etapas de produção e seus respectivos produtos estão esquematizados no fluxograma simplificado da figura 1.4.



**Figura 1.4** Fluxograma das etapas de produção da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada).  
Fonte: Rodrigues 2009.

A vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é indicada para bebês a partir de dois meses de idade. Sua administração deve seguir o esquema adotado pelo PNI que recomenda, para menores de um ano, três doses da vacina com dois, quatro e seis meses de vida; e, para maiores de um ano, duas doses da vacina, com intervalo de dois meses entre elas (Bio-Manguinhos 2012).

Além de produzir a vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), em 2001, Bio-Manguinhos passou, também, a produzir o componente Hib para ser combinado com a vacina DTP (Difteria, Tétano e Pertussis) – fornecida pelo Instituto Butantan – originando a vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* b (conjugada). Esta vacina protege, ao mesmo tempo, contra difteria, tétano, coqueluche e infecções graves causadas pelo Hib (Bio-Manguinhos 2009, Gadelha e Azevedo 2003).

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é indicada para bebês a partir de dois meses. Sua administração, também, deve seguir o esquema adotado pelo PNI, que recomenda três doses da vacina com dois, quatro e seis meses de vida. Caso o esquema não possa ser cumprido, recomenda-se completá-lo até os 12 meses. A vacina é contraindicada para maiores de sete anos de idade (Bio-Manguinhos 2012).

#### **1.4 A IMPORTÂNCIA DA VACINAÇÃO E DE UM CONTROLE DE QUALIDADE EFETIVO DAS VACINAS**

A OMS define como vacina qualquer preparo que induza imunidade a alguma doença, estimulando a produção de anticorpos. As vacinas são capazes de imunizar os indivíduos contra doenças causadas por microrganismos, através da inativação ou atenuação de suas culturas, a fim de eliminar sua ação patogênica e conservar sua propriedade de induzir uma resposta imunológica contra o agente agressor (Nature 2011).

A vacinação sensibiliza o sistema imunológico, prevenindo o surgimento e reduzindo com eficácia as mortes promovidas por patógenos específicos. O processo pelo qual se desenvolve a proteção conferida pelas vacinas compreende o conjunto de mecanismos, através dos quais o organismo humano reconhece uma substância como exógena para, posteriormente, metabolizá-la, neutralizá-la e/ou eliminá-la. Isto permite ao sistema imunológico de um indivíduo imunizado reagir rápida e eficazmente quando exposto a patógenos específicos (Martins 2011).

As vacinas são os agentes mais efetivos disponíveis no campo da prevenção, controle e erradicação de doenças infecciosas. No caso das doenças promovidas por *Haemophilus influenzae* tipo b a vacinação se tornou a melhor forma de prevenção, já que começaram a surgir linhagens resistentes aos agentes antimicrobianos e os antibióticos utilizados na época se tornaram ineficientes (Lorthiois 2007, Martins 2011).

Antes do desenvolvimento da vacina, a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b podia ser isolada em cerca de 0,5 % a 3,0 % das crianças saudáveis, inclusive dentre aquelas que não apresentam quadro clínico característico da doença. Com a implementação de programas de vacinação abrangentes e a aplicação do esquema completo de imunização, vários países praticamente eliminaram doenças como, por exemplo, a meningite e a pneumonia (Lorthiois 2007).

Entretanto, a eficácia da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) na prevenção da meningite está entre 95 e 100 %, o que torna provável a ocorrência de casos de meningite por *Haemophilus influenzae* em indivíduos já vacinados, devido à imunogenicidade da vacina produzida estar diretamente relacionada a fatores, tais como: o tipo do carregador proteico empregado; o tamanho da cadeia polissacarídica; o método pelo qual é realizada a conjugação química; a proporção polissacarídeo/proteína; e, a presença de molécula espaçadora (Bio-Manguinhos 2012).

Para obter conjugados com características físico-químicas bem definidas, esses parâmetros devem ser controlados, a fim de garantir a reprodutibilidade do processo, o que torna importante o desenvolvimento de métodos apropriados de controle de qualidade do produto final. Pesquisas continuam a serem feitas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo (Lorthiois 2007, Silva 2008).

## **1.6 A QUÍMICA ANALÍTICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS**

Embora a produção de vacinas seja assegurada por processos cada vez mais robustos e reprodutíveis, é necessário garantir o mínimo, porém alto padrão de qualidade dos produtos, internacionalmente estabelecidos. Para tal, a atuação das Agências Regulatórias, como por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é imperativa (Metz et al. 2002).

O produto final obtido nas etapas de produção de vacinas deve ser investigado quanto à sua identidade, esterilidade, estabilidade, segurança e potência, por metodologias validadas, tanto pelo produtor quanto pelo laboratório nacional onde o produto será disponibilizado, a fim de atender aos níveis de qualidade pré-determinados (Metz et al. 2002). Dentro desse contexto, a Química Analítica moderna se insere.

A Química Analítica funciona como uma ferramenta tanto para obter informações quanto para a resolução de problemas. No passado, baseando-se em princípios físico-químicos, muitos esforços foram adotados para o desenvolvimento de métodos de medição cada vez mais sofisticados. Assim, atualmente há um vasto número de diferentes técnicas e metodologias analíticas, prontas para serem utilizadas, a fim de resolver qualquer problema específico (de la Guardia 1999).

Dentro do controle de qualidade de vacinas em especial, há um interesse em se conhecer, tanto quanto possível, a matriz de análise e não apenas as espécies envolvidas (Castro 2012). No caso de vacinas conjugadas, torna-se necessário avaliar o conteúdo de seus constituintes (polissacarídeo - proteína) e determinar a quantidade dessas moléculas, principalmente o PRP, na composição da vacina já que sua imunogenicidade está intimamente relacionada a este fator. Por este motivo, torna-se importante o desenvolvimento de um método apropriado para um controle de qualidade efetivo do produto final.

## **1.7 INTRODUÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA ANIÔNICA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS CONJUGADAS**

Nos últimos anos tem sido observado um grande esforço na utilização de técnicas instrumentais, sofisticadas e precisas, para melhorar a qualidade da detecção e quantificação de diversos componentes em diferentes matrizes, na busca da otimização da precisão, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos (Barbosa et al. 2011).

Diversas metodologias analíticas vêm sendo desenvolvidas para o controle de qualidade de vacinas conjugadas, a fim de estabelecer parâmetros que comprovem sua estabilidade e imunogenicidade. Na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), em especial, é imperativo o uso de um método suficientemente sensível para a determinação do conteúdo de polissacarídeo.

Uma metodologia comumente utilizada é o método de Bial (orcinol), um teste colorimétrico para a determinação de ribose que, utiliza ácido clorídrico, orcinol e cloreto férrico. O ácido rompe as ligações glicosídicas e desidrata os monossacarídeos para a condensação com o orcinol, bem como oxida os grupos cetônicos livres, a uma temperatura de 100 °C, durante 20 minutos. Um complexo estável de coloração verde é formado, cuja absorvância é detectável por espectrofotometria de absorção no visível em um comprimento de onda de 670 nm. Este método, porém, necessita ser realizado sob condições estritamente controladas de temperatura e tempo (Soto et al. 2002). Além disso, a lactose utilizada como estabilizador da vacina conjugada produz interferências no ensaio de orcinol (Bardotti et al. 2000).

Para contornar a interferência produzida pela lactose, uma alternativa indireta para a determinação do conteúdo de polissacarídeo é realizada com base na taxa de agregação antígeno-anticorpo. Contudo, este método requer reagentes especiais, como um anticorpo específico para o polissacarídeo e os resultados da análise traduzem valores estimados (Tsai et al. 1994).

Assim, a introdução da cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) por troca aniônica, acoplada à detecção amperométrica pulsada, proporcionou um incremento às determinações de polissacarídeos em vacinas conjugadas, sendo seu uso já recomendado pela Farmacopéia Européia. Estudos recentes demonstram que a técnica é eficiente na quantificação direta do polissacarídeo em níveis picomolares sendo, porém, necessárias algumas etapas de pré-tratamento da amostra para a sua adequabilidade ao sistema de detecção (Bardotti et al. 2000, Talaga et al. 2002 e Tsai et al. 1994).

Contudo, a etapa de pré-tratamento de amostras não deve ser considerada como uma desvantagem da técnica, pois, geralmente, a mesma constitui uma parte crítica dos protocolos de Química Analítica. Esta etapa, além de permitir a detecção do analito, é determinante da qualidade do resultado a ser obtido. Segundo Orlando (2009), a escolha do tipo de tratamento empregado deve ser feita em função das características da matriz e do analito de interesse, bem como das condições de análise empregadas, considerando-se ainda a eliminação de possíveis interferentes.

A fim de adequar a vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) ao sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica, a literatura sugere que seja realizada uma hidrólise, utilizando hidróxido de sódio. A hidrólise alcalina

tem por objetivo despolimerizar o polissacarídeo em unidades simples de ribose-ribitol-fosfato e permitir a determinação desses monômeros de polissacarídeo hidrolisado em coluna de troca iônica sob condições alcalinas extremas. A detecção das unidades separadas é feita através de um detector amperométrico pulsado e é baseada na medida quantitativa da corrente resultante da oxidação de carboidratos, já que são agentes redutores em meio alcalino (Bardotti et al. 2000, Talaga et al. 2002 e Tsai et al. 1994).

## **1.8 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA POR TROCA IÔNICA**

### **1.8.1 Considerações gerais**

As técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), são amplamente utilizadas, uma vez que fornecem alta resolução, sensibilidade e versatilidade, com simples tratamento da amostra (Lavizzari et al. 2006). Dentro deste grupo de técnicas, está a cromatografia a líquido de alta eficiência por troca iônica, que pode ser definida como um método analítico, moderno e eficiente, de separação e determinação de íons com base em colunas empacotadas com um material sólido trocador de íons (Fritz e Gjerde 2009).

Também denominada por cromatografia iônica, a técnica foi desenvolvida na década de 1970 (Fritz e Gjerde 2009), quando foi demonstrado que misturas de cátions e ânions podiam ser facilmente resolvidas em colunas de CLAE com resinas trocadoras de cátions e ânions como fases estacionárias. Nesta época, a detecção era feita por medidas de condutividade. Atualmente, outros detectores estão disponíveis e a técnica é considerada um instrumento indispensável na química analítica moderna, possuindo boa reprodutibilidade e confiabilidade (Klein 2010).

### **1.8.2 Princípios básicos da técnica**

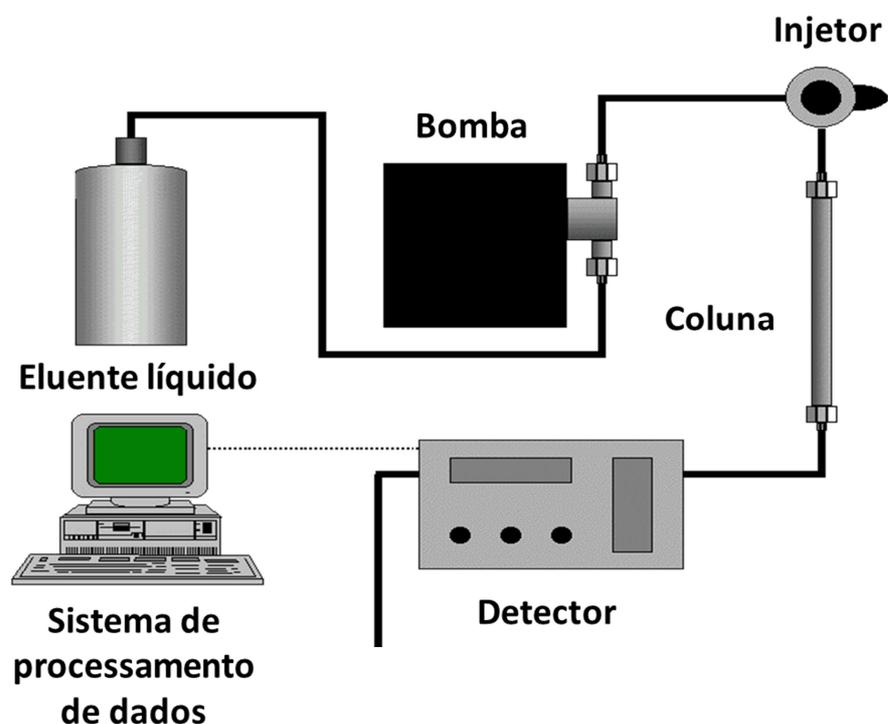
A cromatografia por troca iônica é uma técnica específica de cromatografia a líquido, tendo um sólido como fase estacionária e um líquido como fase móvel. Seus processos se baseiam em equilíbrios de troca entre os íons presentes na amostra e os contraíons da fase estacionária, geralmente, um sólido de alto peso molecular trocador de íons, formado a partir de polímeros de estireno e divinil-benzeno ou de sílicas funcionalizadas (Cromatografia iônica 2012, Klein 2010, Silva 2005).

O princípio de separação de ânions e cátions é muito semelhante, estando a eficiência da separação destes íons condicionada fortemente à sua interação com os grupamentos funcionais da fase estacionária. Em geral, o trocador de íons é um polímero complexo cuja carga elétrica é neutralizada pelas cargas elétricas dos contra íons (Klein 2010).

Em amostras analíticas, os ânions são separados numa coluna empacotada com uma resina trocadora de ânions, do mesmo modo que os cátions são separados numa coluna empacotada com uma resina trocadora de cátions (Fritz e Gjerde 2009). Para a troca de ânions são utilizados aminas e sais quaternários de amônio, enquanto para a troca de cátions os grupos derivados do ácido sulfônico e do ácido carboxílico são utilizados (Klein 2010).

### 1.8.3 Instrumentação

A instrumentação da cromatografia iônica (Figura 1.5) consiste, basicamente, de um eluente líquido, uma bomba de alta pressão e reguladora de fluxo, um injetor de amostra, uma coluna analítica, um sistema de detecção e um sistema para o processamento dos dados (Fritz e Gjerde 2009; Silva 2005).



**Figura 1.5** Componentes da instrumentação da cromatografia iônica. Adaptado de: <http://pfarma.com.br>.

A fase móvel pode ser obtida pela dissolução de ácidos, bases ou ainda por soluções-tampão, em solvente aquoso ou em uma mistura de solventes aquoso-orgânico (Fritz e Gjerde 2009; Klein 2010). O eluente, no entanto, deve ter as mesmas propriedades gerais requeridas nos demais tipos de cromatografia: deve dissolver a amostra, ter uma força de solvente que leve a tempos de retenção razoáveis e deve interagir com os solutos de modo a promover a separação das espécies (Cromatografia iônica 2012).

Em um sistema de cromatografia por troca iônica, a bomba deve ser completamente inerte, robusta, promover alta precisão para a obtenção de resultados reprodutíveis e, preferencialmente, ser livre de pulsações. Além disso, é possível ainda obter um sistema regulador de fluxo que permite alterações programadas na composição do eluente (Fritz e Gjerde 2009).

A unidade de injeção de amostra tem por objetivo introduzir um volume pequeno e preciso da amostra para a separação cromatográfica. Este sistema pode ser manual ou automatizado (amostrador automático, que permite o armazenamento de várias amostras para a injeção automática) (Fritz e Gjerde 2009).

As colunas utilizadas na cromatografia por troca iônica são constituídas por uma fase estacionária, cuja capacidade é uma medida da quantidade de troca de íons que pode ocorrer entre a matriz e os íons presentes na fase móvel (Klein 2010).

Em relação aos detectores, podem ser utilizados diferentes tipos, dentre os quais se destacam o de condutividade, o espectrofotométrico e o amperométrico, dentre outros (Silva 2005).

O detector de condutividade foi o primeiro a ser utilizado e, ainda hoje, permanece como o mais popular e mais difundido. A detecção por condutividade é universal, resistente e sensível (Fritz e Gjerde 2009, Klein 2010). O detector espectrofotométrico (UV-VIS) é recomendado para ânions como nitratos, brometos ou iodetos e, para cátions, na determinação de amônia e para quelatos de metais de transição. Já o detector amperométrico que, em geral, é bastante sensível, pode ser utilizado para todos os compostos que podem ser facilmente oxidados ou reduzidos (Klein 2010).

A instrumentação se completa com um processador de dados, que é acoplado à saída do detector de modo a obter um registro digital da separação cromatográfica. Assim, o cromatograma completo obtido na análise pode ser visto em uma tela de computador ou mesmo impresso (Fritz e Gjerde 2009).

#### 1.8.4 Vantagens e desvantagens

Como toda técnica analítica, a cromatografia a líquido de alta eficiência por troca iônica apresenta vantagens e desvantagens. Evidentemente, conhecê-las é fundamental para qualquer profissional interessado em propor uma nova metodologia, assim como o entendimento do problema analítico como um todo, e, não somente, limitando sua atenção ao conhecimento da amostra.

Frente a outros métodos analíticos, a técnica apresenta, como vantagem, permitir a separação de compostos iônicos ou ionizáveis em misturas complexas (orgânicas e inorgânicas) e a quantificação dos íons individuais medidos em um tempo relativamente curto (Fritz e Gjerde 2009), com alta sensibilidade a baixas concentrações, utilizando pequenos volumes de amostra.

Por outro lado, devido a sua alta sensibilidade, a técnica apresenta algumas desvantagens relativas ao custo da instrumentação da técnica e de seus insumos, pois requer reagentes de alta pureza e, conseqüentemente, alto valor agregado. Além disso, a água utilizada nas análises também deve ser de alta pureza, estar dentro de uma faixa aceitável de condutividade e, preferencialmente, estar livre de íons dissolvidos.

#### 1.8.5 Aplicações

A cromatografia a líquido de alta eficiência por troca iônica apresenta aplicações das mais diversas, tanto na pesquisa quanto na indústria destacando-se, principalmente, na área de Química Analítica, na determinação de cátions e ânions em águas ou soluções aquosas diluídas (Klein 2010). Segundo Metz et al. (2002), a cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD – *High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) – pode ser empregada na determinação de polissacarídeos. Outras áreas também apresentam aplicações da técnica como na Biologia, para a separação de isoenzimas, e na Bioquímica, para a separação de aminoácidos (Klein 2010).

Neste trabalho, especificamente, a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica será aplicada para a otimização dos parâmetros analíticos do método de determinação do conteúdo de polissacarídeo contido na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) utilizado no controle de qualidade do

produto final, realizado pelo Laboratório Físico-Químico (LAFIQ), pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) localizado no Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

## 1.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de análises qualitativas e quantitativas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um método analítico gere informações seguras, exatas e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser submetido a uma avaliação denominada validação (Ribani et al. 2004)

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Brasil 2003). Isso porque um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso pretendido (Ribani et al. 2004).

De acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), os laboratórios devem dispor de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida, aplicando-a ao seguinte conjunto de métodos (INMETRO 2011):

- Métodos não normalizados;
- Métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- Ampliações e modificações de métodos normatizados.

Cabe ao laboratório decidir quais parâmetros de desempenho do método necessitam ser caracterizados, a fim de validar o método. Assim, até mesmo se um método existente for modificado para atender a requisitos específicos, ou seja, passar por um processo de otimização, o laboratório deve se assegurar de que os parâmetros de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas (INMETRO 2011).

Os parâmetros de desempenho analítico, também denominados de parâmetros analíticos, características de desempenho ou figuras analíticas de mérito, devem ser baseados na intenção do uso do método. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário (Ribani et al. 2004). A Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 define a categoria a qual o teste pertence de acordo com a finalidade, conforme tabela 1.1.

**Tabela 1.1** Classificação dos testes, segundo sua finalidade. Fonte: Brasil 2003.

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

Para cada categoria, um conjunto de parâmetros será exigido, de acordo com o disposto na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2** Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. Fonte: Brasil 2003.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria V	
		Quantitativo	Ensaio limite			
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Faixa linear	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não	
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	

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

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da Precisão Intermediária.

Os parâmetros de desempenho mais comumente utilizados na validação de métodos analíticos estão definidos a seguir.

### 1.9.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade que um método instrumental de separação possui de medir exatamente as substâncias em exame, na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Isto permite avaliar o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade pode ser avaliada das seguintes maneiras (Brasil 2003, Ribani et al. 2004):

- Comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão). Nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra;
- Comparando o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, (utilizando detectores modernos, como o de arranjo de diodos ou um espectrômetro de massas), obtendo, assim, uma indicação da presença do composto puro;
- Pelo método de adição padrão, quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica, sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto, o método é seletivo;
- Através da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse como, por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos.

Em métodos cromatográficos, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (Brasil 2003). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO 2011).

### **1.9.2 Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil 2003). Para avaliação da linearidade é necessário se obter uma relação entre a concentração do analito e as respostas obtidas que, na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), correspondem à área de pico cromatográfico, e verificar se a relação entre eles obedece a um modelo linear. A relação é obtida através da confecção de uma curva analítica construída pelo uso de, no mínimo, cinco concentrações equidistantes de analito e da verificação de suas respostas, a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) (INMETRO 2011).

### **1.9.3 Intervalo**

É o intervalo entre os limites de quantificação inferior e superior de um método analítico. Este parâmetro geralmente é derivado do estudo de linearidade e representa a faixa de concentrações onde o método pode ser aplicado. Para determinações quantitativas de fármacos e medicamentos, a recomendação é que o intervalo esteja compreendido entre 80 % e 120 % da concentração teórica, sendo expresso nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método (Brasil 2003).

### **1.9.4 Precisão**

Precisão é a característica que avalia o grau de proximidade entre os resultados individuais de um teste, quando se aplica o método analítico a múltiplas preparações de uma amostra homogênea. A precisão pode ser medida através do grau de repetitividade, precisão intermediária e/ou reprodutibilidade do método

analítico sob condições normais de operação (Brasil 2003). Usualmente é expressa através do cálculo do desvio padrão ou, percentualmente, do cálculo do coeficiente de variação (INMETRO, 2011). O coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD), é calculado da seguinte forma:

$$CV = RSD = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

#### **1.9.4.1 Repetitividade**

Também denominada precisão intra-corrída (Brasil 2003), a repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições realizadas em um curto espaço de tempo (INMETRO 2011).

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três replicatas cada ou mínimo de seis determinações a 100 % da concentração do teste (Brasil 2003).

#### **1.9.4.2 Precisão intermediária**

Também denominada precisão inter-corrídas (Brasil 2003), a precisão intermediária é considerada o teste mais representativo da variabilidade dos resultados em um laboratório. Refere-se à concordância entre os resultados de uma mesma amostra, em um mesmo laboratório, com o mesmo método, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (INMETRO 2011). Para a determinação da precisão intermediária, a ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

### 1.9.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos de estudos colaborativos entre laboratórios, verificando o desempenho de seus métodos aos dados de validação obtidos por comparação interlaboratorial. Geralmente os dados de reprodutibilidade são aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (Brasil 2003).

### 1.9.5 Limite de detecção

O Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil 2003). O LD pode ser calculado das seguintes maneiras:

- Visualmente: é utilizado para a determinação do LD de métodos não instrumentais como, por exemplo, cromatografia de camada delgada, titulação, comparação de cor. Esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc) (Brasil 2003).

- Relação sinal-ruído: pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base estabelecendo, assim, uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. O LD pode ser determinado pela seguinte equação (Brasil 2003, Ribani et al. 2004):

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Onde:

$DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva analítica, proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco.

IC = inclinação da curva de analítica.

- Com base em parâmetros da curva analítica: uma curva analítica é feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão relativo destes parâmetros podem ser calculados através de *softwares* como o Microsoft Excel<sup>®</sup>. Desta maneira o LD pode ser expresso como (Ribani et al. 2004):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

$s$  = estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

$S$  = inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

- Graficamente, como proposto por Souza e Junqueira (2005).

### 1.9.6 Limite de quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas e de produtos de degradação (Brasil 2003).

Assim como o LD, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído, o método gráfico e a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva

analítica, utilizando a relação 10:1. É expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra (Ribani et al. 2004). O LQ pode ser calculado a partir da equação (Brasil 2003):

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Onde:

$DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de analítica construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de analítica proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco.

IC = inclinação da curva de analítica.

### 1.9.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos pelo método em um determinado ensaio em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro. É sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão) (Ribani et al. 2004).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; adição padrão; participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A ANVISA recomenda que a exatidão do método seja determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da especificidade do mesmo e estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. A recuperação é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

### 1.9.8 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método é considerado robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros analíticos. Sua avaliação deve ser considerada durante o desenvolvimento da metodologia e, constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (Ribani et al. 2004).

Para métodos cromatográficos, a ANVISA recomenda que os seguintes fatores devam ser considerados na determinação da robustez do método analítico:

- Variação do pH da fase móvel
- Variação na composição da fase móvel
- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
- Temperatura
- Fluxo da fase móvel

Estas mudanças introduzidas na metodologia refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (Ribani et al. 2004).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar o método analítico de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) empregando a técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica com detecção amperométrica pulsada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta do método à mudança na *waveform* de trabalho, a fim de reduzir a perda de sinal devido à degeneração da superfície do eletrodo e, aumentar a precisão do método ao longo do tempo, bem como a vida útil do eletrodo;
- Otimizar as condições cromatográficas no que concerne aos parâmetros de adequação do sistema;
- Otimizar as condições de hidrólise alcalina a fim de acelerar a obtenção do analito de interesse (monômero de poliribosil-ribitol-fosfato), diminuindo o tempo necessário para o pré-tratamento das amostras;
- Validar a metodologia proposta.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório Físico-Químico (LAFIQ), pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) localizado no Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

#### 3.1 AMOSTRAS DE TRABALHO E PADRÃO

A vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) utilizada neste trabalho é a vacina obtida através da conjugação de, no mínimo, 10 µg/dose de polissacarídeo capsular purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b com, aproximadamente, 30 µg/dose de proteína monomérica tetânica (PMT), utilizando lactose como excipiente.

A população amostral foi obtida a partir do arquivo de lotes de vacinas produzidas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), dentro da vigência do prazo de validade e devidamente aprovadas pelos métodos preconizados nos compêndios oficiais. Para a realização de testes preliminares, foram utilizadas amostras de vacina unidose e cinco doses de lotes variados. Para a validação, foram utilizadas amostras de vacina cinco doses, de um mesmo lote, o 116VZF022Z.

O padrão utilizado para a construção da curva analítica é um material de referência (MR) *in house*, certificado, elaborado no LAFIQ por Rodrigues (2009) – lote MR 01/2008 – constituído de uma solução de PRP, na sua forma livre, em água para injetáveis, na concentração teórica de 500 µg/mL.

Desde o recebimento até a completa execução dos experimentos deste trabalho, amostras e material de referência permaneceram estocados em câmara fria a uma temperatura de 2 a 8 °C, sendo retiradas desta condição apenas para a realização dos testes. Este procedimento foi adotado a fim de garantir as mesmas condições de armazenamento da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada).

### 3.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO UTILIZADO

Sistema cromatográfico de íons da marca Dionex, modelo ICS-3000, equipado com um amostrador/injetor automático, modelo AS-1. A detecção foi realizada por amperometria pulsada, utilizando eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência pH-Ag/AgCl. A separação foi realizada em coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm, Dionex Corporation) precedida por duas pré-colunas, a AminoTrap (3 x 30 mm, Dionex Corporation) e a BorateTrap (4 x 50 mm, Dionex Corporation). Os cromatogramas foram tratados através do *software* Chromeleon, versão 6.8.

### 3.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A fim de aprimorar o controle de qualidade da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), foi realizada a otimização de parâmetros analíticos e de algumas etapas do método de determinação do conteúdo de polissacarídeo contido no produto final, por cromatografia a líquido de alta eficiência por troca aniônica com detecção amperométrica pulsada, utilizado no controle de qualidade do produto final realizado pelo Laboratório Físico-Químico (LAFIQ), descrito na instrução de trabalho (IT) número 0233 - “Determinação do conteúdo de polissacarídeo por HPLC”.

#### 3.3.1 *Waveform*

A sequência de potenciais aplicados no eletrodo de trabalho, a *waveform* (ou forma de onda), foi o primeiro parâmetro analítico otimizado. Foi avaliado se a *waveform A standard quad* seria mais eficaz do que a *waveform B triple potencial*, utilizada no método em vigor, em regenerar a superfície do eletrodo, evitando assim a perda de sinal e promovendo reprodutibilidade em longo prazo.

Para tal, o procedimento adotado na IT 0233 foi seguido rigorosamente. Duas corridas cromatográficas foram desenvolvidas em dias consecutivos, uma com a *waveform B* e a outra com a *waveform A*, utilizando preparos independentes de fase móvel, de curva analítica e de amostra.

### 3.3.1.1 Preparo da fase móvel

Para o desenvolvimento das duas corridas cromatográficas, foi utilizada como fase móvel uma solução contendo 100 mmol/L de acetato de sódio (Merck KGaA, lote A0202268) e 190 mmol/L de hidróxido de sódio (Merck KGaA, lote B0209893) em água ultrapura, obtida em um sistema de purificação de água Milli-Q (Merck Millipore). A solução foi filtrada em membrana em éster de celulose (Merck Millipore) de 0,22 µm de diâmetro do poro, em sistema de filtração (Merck Millipore) a vácuo (GE Motors & Industrial System, modelo 5KH33DN16HX) acoplado a banho ultrassônico (Branson, modelo B3510). Para completa desgaseificação, borbulhou-se a solução com gás hélio (White Martins) por, aproximadamente, 5 minutos.

### 3.3.1.2 Preparo da curva analítica

Para a construção da curva analítica, foi preparada uma solução padrão-estoque de 50 µg/mL através da transferência de 1,0 mL de material de referência de PRP para balão volumétrico de 10,00 mL, avolumando com água ultrapura ao traço de aferição. Os pontos da curva foram preparados seguindo as diluições indicadas na tabela 3.1, diretamente em um frasco amostrador de 10 mL (Dionex Corporation). Para promover a adequabilidade ao sistema de detecção, foram adicionados 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L (Merck KGaA, lote HC124787) em cada um dos pontos da curva, obtendo-se um volume final de 5,0 mL.

**Tabela 3.1** Preparo dos pontos da curva analítica.

	Concentração teórica (µg/mL)	Volume da solução padrão-estoque (mL)	Volume de água ultrapura (mL)
P1	5,0	0,5	4,0
P2	10,0	1,0	3,5
P3	15,0	1,5	3,0
P4	20,0	2,0	2,5
P5	25,0	2,5	2,0

### 3.3.1.3 Preparo da amostra

Um frasco de vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) 5 doses (lote 084VZF011Z) foi reconstituído com água ultrapura e transferido para balão volumétrico de 5,00 mL. Foram adicionados 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L (Merck KGaA, lote HC124787) e avolumou-se com água ultrapura ao traço de aferição. Esta solução foi transferida para um frasco amostrador de 10 mL.

### 3.3.1.4 Parâmetros cromatográficos

A análise cromatográfica foi desenvolvida sete horas após a adição de hidróxido de sódio, a uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 120  $\mu$ L, em um *loop* de 25  $\mu$ L. A temperatura da coluna foi de 27 °C. O tempo de cada corrida foi de 17 minutos.

### 3.3.2 Tempo de retenção

Visando a obtenção do sinal cromatográfico referente ao PRP em um menor tempo de retenção, foram testadas modificações na concentração dos componentes da fase móvel, de acordo com a tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Concentração dos componentes da fase móvel do método não otimizado e suas subsequentes modificações.

	Método não otimizado	Fase I	Fase II	Fase III
Acetato de sódio	100 mmol/L	100 mmol/L	0,2 mmol/L	0,2 mmol/L
Hidróxido de sódio	190 mmol/L	1 mol/L	1 mol/L	0,7 mol/L

As soluções obtidas foram filtradas através de membrana de éster de celulose de 0,22  $\mu$ m de diâmetro do poro, em sistema de filtração a vácuo acoplado a banho ultrassônico. Para completa desgaseificação, utilizou-se também a desgaseificação com borbulhamento de hélio por, aproximadamente, 5 minutos.

A fim de avaliar o efeito das modificações sobre o tempo de retenção do sinal de interesse, para cada uma das fases ajustadas, foi desenvolvida uma corrida cromatográfica da curva analítica com as soluções dos padrões e de uma amostra de vacina, adotando-se os mesmos parâmetros cromatográficos utilizados no método não otimizado.

### 3.3.3 Hidrólise alcalina

Para a otimização da etapa de hidrólise alcalina, foram realizados experimentos utilizando diferentes concentrações de hidróxido de sódio para o pré-tratamento do padrão de PRP e da vacina conjugada de Hib. Cada ensaio foi avaliado com injeções consecutivas do mesmo frasco amostrador, desde o momento da adição de hidróxido de sódio até completar, aproximadamente, oito horas de corrida cromatográfica.

Nas análises cromatográficas foi utilizado um fluxo de fase móvel de 1 mL/min, com eluição isocrática. A fase móvel foi composta de solução de acetato de sódio 0,2 mmol/L e solução de hidróxido de sódio 0,7 mol/L. O volume de injeção foi de 50 µL. A temperatura da coluna foi de 27 °C. O tempo de cada corrida foi de 12 minutos.

## 3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

Segundo a Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003, conforme sua finalidade, este trabalho encontra-se classificado na Categoria I (tabela 1.1). Assim, para a validação do método otimizado, visando determinar o conteúdo de polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) na vacina conjugada de Hib foram avaliados os seguintes parâmetros de adequação do sistema cromatográfico: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez. Embora não necessários para a validação desta categoria de testes, os limites de detecção e de quantificação também foram determinados.

### 3.4.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada através de injeções individuais de todos os componentes da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), bem como de amostras de vacina fortificadas com o material de referência de PRP e com a proteína monomérica tetânica (PMT) (tabela 3.3).

O objetivo foi verificar se o sinal cromatográfico utilizado para a quantificação do polissacarídeo de Hib sofreu interferência dos outros componentes da formulação (coeluição). Foi observado se não havia sobreposição do pico de interesse com os demais sinais presentes nos cromatogramas.

**Tabela 3.3** Componentes utilizados para avaliação de seletividade do método e seus respectivos modo de preparo.

Água	Transferiu-se 5,0 mL de água ultrapura diretamente para um frasco amostrador de 10 mL
Água + NaOH	Em um frasco amostrador de 10 mL foram adicionados 4,5 mL de água ultrapura e 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L
Lactose	Preparou-se uma solução de lactose (Kerry Bio-Science, lote 1320016523) contendo 50 µg/mL. Transferiu-se 4,5 mL desta solução para um frasco amostrador de 10 mL e adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L
PRP	Uma solução 10 µg/mL de material de referência de PRP foi preparada. Transferiu-se 4,5 mL desta solução para um frasco amostrador de 10 mL e adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L
PMT	Uma solução de PMT (Tecpar, lote 002/12) contendo 24 µg/mL foi preparada. Transferiu-se 4,5 mL desta solução para um frasco amostrador de 10 mL e adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L
Vacina	Reconstituiu-se um frasco de vacina (lote 116VZF022Z) com água ultrapura em balão volumétrico de 5,00 mL. Adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi transferida para um frasco amostrador de 10 mL
Vacina + PRP	Reconstituiu-se um frasco de vacina (lote 116VZF022Z) com 1,0 mL da solução padrão-estoque com 50 µg/mL de material de referência de PRP para um balão volumétrico de 5,00 mL. Adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi transferida para um frasco amostrador de 10 mL
Vacina + PMT	Reconstituiu-se um frasco de vacina (lote 116VZF022Z) com a solução de PMT (Tecpar, lote 002/12) 24 µg/mL para um balão volumétrico de 5,00 mL. Adicionou-se 0,5 mL de solução de NaOH 10,0 mol/L e o volume foi completado com a mesma solução. A solução foi transferida para um frasco amostrador de 10 mL

### 3.4.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método cromatográfico foram construídas três curvas analíticas independentes, com sete níveis de concentração de padrão. Foi preparada uma solução padrão-estoque de 50 µg/mL através da transferência de 1,0 mL de material de referência de PRP para balão volumétrico de 10,00 mL, avolumando com água ultrapura ao traço de aferição. De forma a abranger o intervalo de trabalho do método, os pontos da curva foram preparados seguindo as diluições indicadas na tabela 3.4, diretamente em um frasco amostrador de 10 mL. Cada um dos pontos da curva foi medido em triplicata, caracterizando ensaios mutuamente independentes. Para a regressão linear adotou-se o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

**Tabela 3.4** Preparo dos pontos da curva analítica para a avaliação da linearidade do método.

	Concentração teórica (µg/mL)	Volume da solução padrão-estoque (mL)	Volume de água ultrapura (mL)
P1	1,0	0,10	4,40
P2	2,5	0,25	4,25
P3	5,0	0,50	4,00
P4	10,0	1,00	3,50
P5	15,0	1,50	3,00
P6	20,0	2,00	2,50
P7	25,0	2,50	2,00

A avaliação da linearidade foi realizada através da *planilha de avaliação de linearidade de curva analítica*, elaborada por Souza e Junqueira (2005). Os parâmetros envolvidos na verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear foram: normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; verificação da significância da regressão e do ajuste ao modelo linear por análise de variância (ANOVA).

### 3.4.3 Intervalo

O intervalo do método foi obtido baseado nos ensaios de linearidade, a fim de determinar a faixa de concentrações onde o método pode ser aplicado. A ANVISA estabelece que, para determinações quantitativas do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas, o intervalo deve compreender de 80 a 120 % da concentração teórica do teste. Logo, considerando que a concentração de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) deve ser no mínimo 10 µg/mL, a faixa de trabalho mínima para o método deve estar entre 2 e 22 µg/mL.

### 3.4.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada a fim de verificar a mínima e a máxima variabilidade que pôde ser alcançada dentro do método proposto. Devido à inviabilidade de se estimar adequadamente a reprodutibilidade do método, a precisão foi determinada pelo grau de repetitividade e através da precisão intermediária, sob condições normais de operação.

#### **3.4.4.1 Repetitividade (precisão intra-corrida)**

A repetitividade do método foi avaliada através de injeções consecutivas de uma amostra de vacina, preparada de acordo com o mesmo procedimento descrito na tabela 3.3. Foram realizadas seis determinações a 100 % da concentração do teste, adotando-se o mesmo procedimento de medição, com o mesmo analista, utilizando-se a mesma instrumentação (sob as mesmas condições), no mesmo laboratório.

#### **3.4.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corridas)**

Os experimentos para a determinação da precisão intermediária foram conduzidos no mesmo laboratório, por dois analistas diferentes em dias diferentes, utilizando a mesma instrumentação analítica. Cada analista realizou preparos independentes de fase móvel, de curva analítica e de amostra de vacina. Foram realizadas seis injeções consecutivas das amostras e os pontos da curva foram injetados em triplicata.

#### **3.4.5 Limites de detecção e quantificação**

Para determinar a menor quantidade de polissacarídeo detectável (LD) e a menor concentração de polissacarídeo quantificável (LQ), sob as condições experimentais estabelecidas no método proposto, foram construídas três curvas analíticas independentes, com sete níveis de concentração. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da planilha *de avaliação de linearidade de curva analítica* elaborada por Souza e Junqueira (2005).

#### **3.4.6 Exatidão**

Para avaliar a exatidão do método, foi realizado um ensaio de recuperação, onde foram adicionadas quantidades conhecidas de material de referência de PRP na amostra. Foram utilizadas quatro amostras de vacina, as quais foram fortificadas com 10, 20, 30 e 40 % de material de referência de PRP. Paralelamente, construiu-se uma curva analítica e preparou-se uma amostra de vacina sem adição

de material de referência de PRP para avaliar a exatidão do método através da recuperação média das amostras fortificadas.

#### **3.4.7 Robustez**

A robustez do método foi aferida durante o desenvolvimento da metodologia. Foram avaliadas pequenas e deliberadas variações em seus parâmetros analíticos, com a finalidade de determinar os fatores que poderiam influenciar seu desempenho e, conseqüentemente, os resultados obtidos.

### **3.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO SINAL QUANTIFICADOR**

Para a elucidação estrutural do sinal quantificador, o pico de interesse foi coletado, manualmente, e submetido à análise por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas e por espectrometria de absorção molecular no ultravioleta (UV).

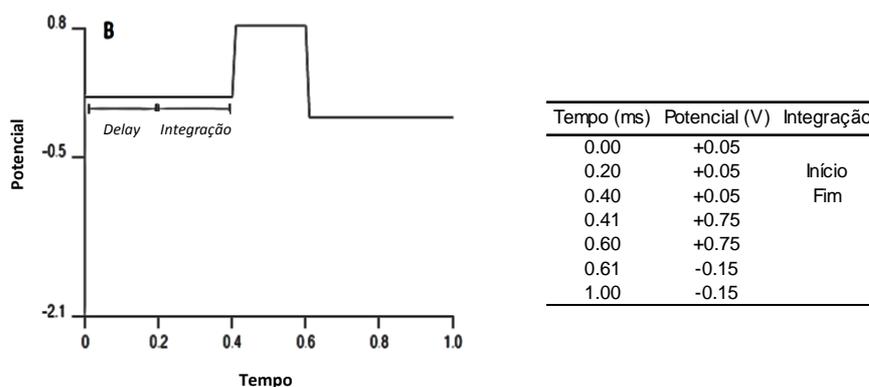
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

#### 4.1.1 *Waveform*

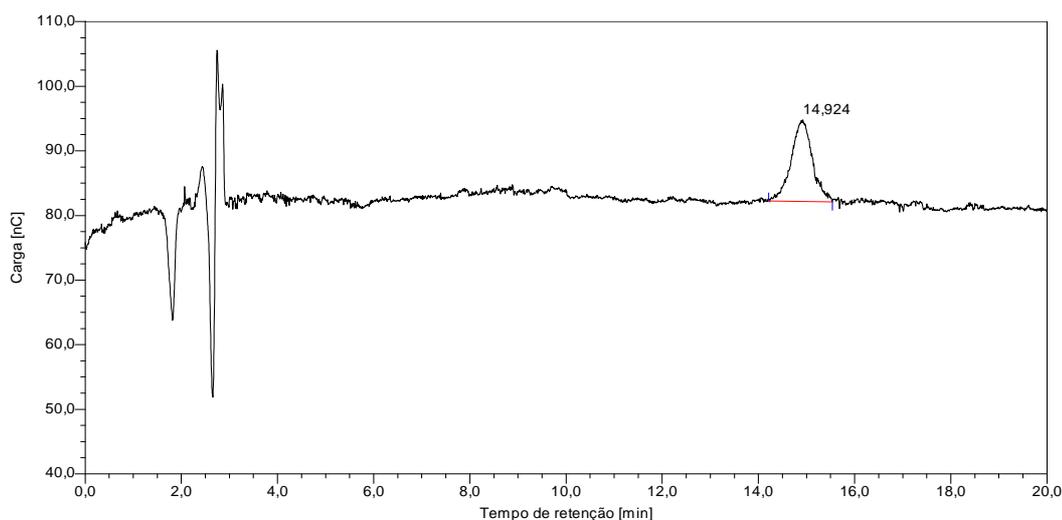
Na detecção amperométrica pulsada, um potencial constante é aplicado no eletrodo de trabalho e as moléculas são oxidadas e reduzidas em sua superfície. Para evitar a perda de sinal, a superfície do eletrodo é regenerada por uma série de potenciais, positivos e negativos, que são aplicados por períodos de tempo fixos, após o potencial de detecção. Essa série de pulsos aplicados durante períodos de tempo definidos é denominada *waveform* ou forma de onda.

Com a introdução do detector eletroquímico modelo ED40, em 1993, foi recomendado pela empresa Dionex o uso da *waveform B triple potencial*, para a separação de carboidratos utilizando gradientes de acetato de sódio. Esta *waveform* foi desenvolvida a fim de aumentar a sensibilidade para carboidratos e minimizar a sensibilidade ao oxigênio dissolvido, bem como diminuir o desvio de linha de base. Entretanto, o potencial oxidativo de limpeza de 0.75 V utilizado na *waveform B* promove desgaste no eletrodo e, por consequência, uma diminuição gradual na área do pico ao longo do tempo. A representação esquemática da *waveform B* e seus respectivos parâmetros podem ser observados na figura 4.1.



**Figura 4.1** À esquerda, representação esquemática da *waveform B*. À direita, a tabela apresenta seus respectivos parâmetros. Adaptado de Dionex 1998.

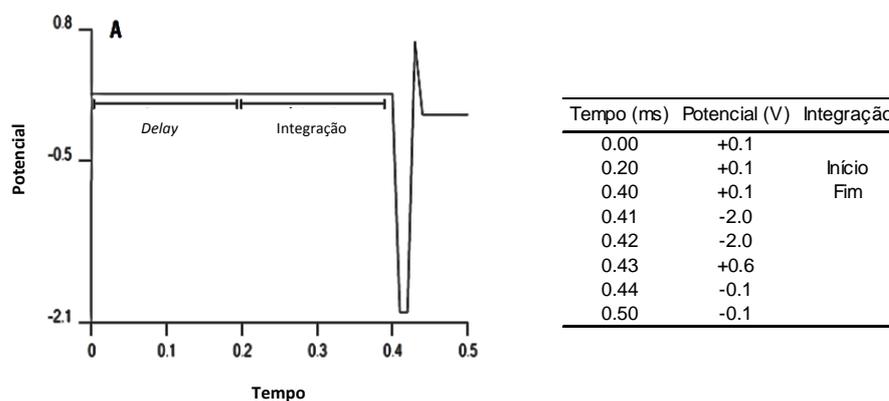
A recomendação do fabricante (Dionex 1998) é que se efetue a troca do eletrodo de trabalho a cada seis meses, para obter melhores resultados. Porém, na rotina das análises com a *waveform B* a necessidade de troca era constatada a cada dois meses, pois o nível de ruído na linha de base era tão alto que impossibilitava a integração do pico de interesse e, conseqüentemente, não permitia a quantificação do polissacarídeo (figura 4.2). É importante também ressaltar que, além da inconstância nos resultados, a troca do eletrodo de trabalho é dispendiosa.



**Figura 4.2** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido em uma análise de rotina com a *waveform B* realizada em 18/06/2012, onde se pode observar o alto ruído na linha de base provocado pelo desgaste do eletrodo.

Para contornar a baixa reprodutibilidade em longo prazo promovida pela *waveform B*, bem como o desgaste do eletrodo de trabalho, a nota técnica 21 (Dionex 1998) do fabricante recomenda o uso da *waveform A standard quad*, que se diferencia por utilizar potenciais negativos para a limpeza do eletrodo. A representação esquemática da *waveform A*, e seus respectivos parâmetros podem ser observados na figura 4.3.

O potencial de detecção da *waveform A* é de 0,1 V, o qual é mantido durante 400 ms (primeiros 200 ms de *delay* e os 200 ms subsequentes de período de detecção). O eletrodo de trabalho é regenerado a -2,0 V, por 10 ms, seguido por um rápido salto a 0,6 V, que forma uma pequena quantidade de óxido de ouro, necessária para manter a superfície do eletrodo de trabalho ativa. O potencial final, de -0,1 V, mantido durante 60 ms, reduz a pequena quantidade de óxido de ouro formada. Desta forma, a *waveform A* minimiza o desgaste do eletrodo e promove uma melhor reprodutibilidade de resposta eletroquímica absoluta (Dionex 1998).



**Figura 4.3** À esquerda, representação esquemática da *waveform* A. À direita, a tabela apresenta seus respectivos parâmetros. Adaptado de Dionex 1998.

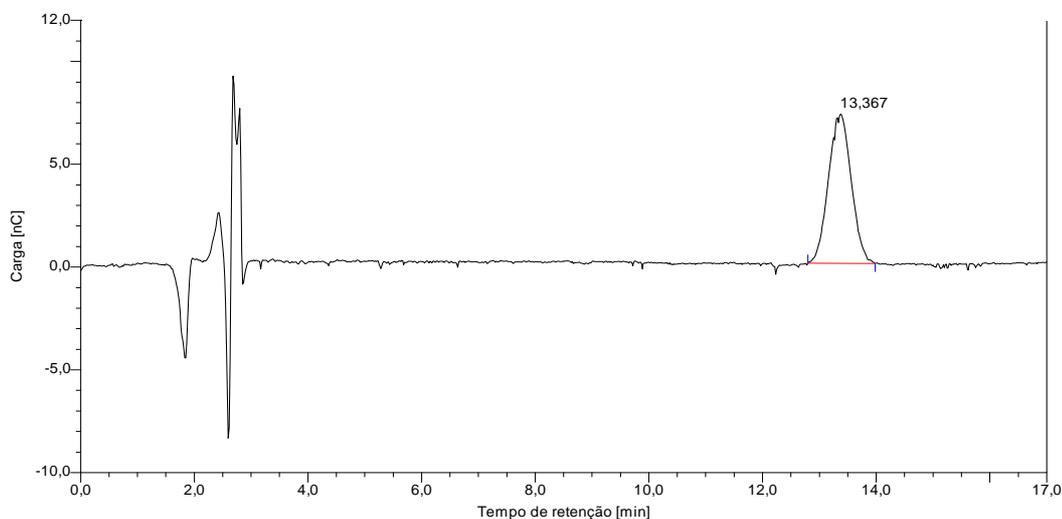
Mediante as vantagens apresentadas pela *waveform* A, foram desenvolvidas duas corridas cromatográficas, uma com a *waveform* B e a outra com a *waveform* A, seguindo rigorosamente o procedimento adotado na IT 0233, que descreve o método de determinação do conteúdo de polissacarídeo no produto final. O objetivo foi avaliar o desempenho do método, frente à utilização de ambas as *waveforms*.

As corridas cromatográficas foram desenvolvidas em dias consecutivos para tentar manter o equipamento sob as mesmas condições de operação, utilizando-se os mesmos consumíveis, tais como coluna, pré-colunas, eletrodo de trabalho e de referência. Esses cuidados foram tomados a fim de promover a menor variabilidade dos resultados inter-corridas, minimizando, assim, o erro aleatório experimental, intrínseco a qualquer processo de medição.

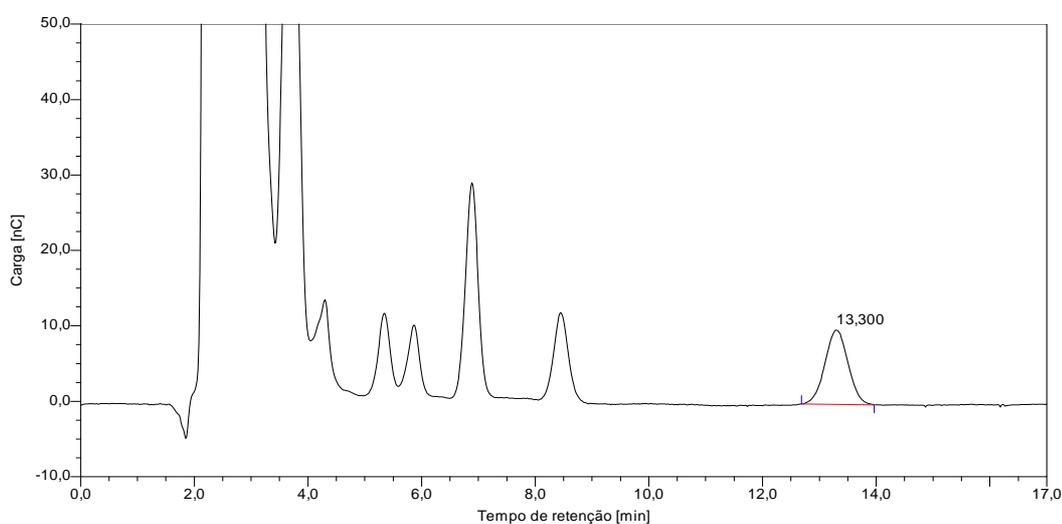
Entretanto, a fase móvel, que é uma importante fonte de variabilidade para o método, teve preparos distintos para cada corrida porque, com a mudança de *waveform* entre uma corrida e outra, foi necessário estabilizar bem o sistema, ou seja, a linha de base, o que levou a um alto consumo de fase móvel, havendo a necessidade de um novo preparo para suprir a corrida cromatográfica com a *waveform* A, realizada no segundo dia de análises.

Uma variabilidade menor também seria conseguida se fosse possível utilizar o mesmo preparo de curva analítica e de amostra para ambas as corridas. Entretanto, segundo a IT 0233, é recomendado o controle do tempo de hidrólise, promovida pela adição de hidróxido de sódio entre, no mínimo, sete horas e, no máximo, vinte e quatro horas. Assim, foram realizados preparos diferentes de curva analítica e de amostra para cada corrida cromatográfica, a fim de desenvolvê-las independentemente com o mesmo tempo de hidrólise.

As figuras 4.4 e 4.5 apresentam, respectivamente, o perfil cromatográfico da injeção do padrão e de uma amostra de vacina obtidos na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform B*.

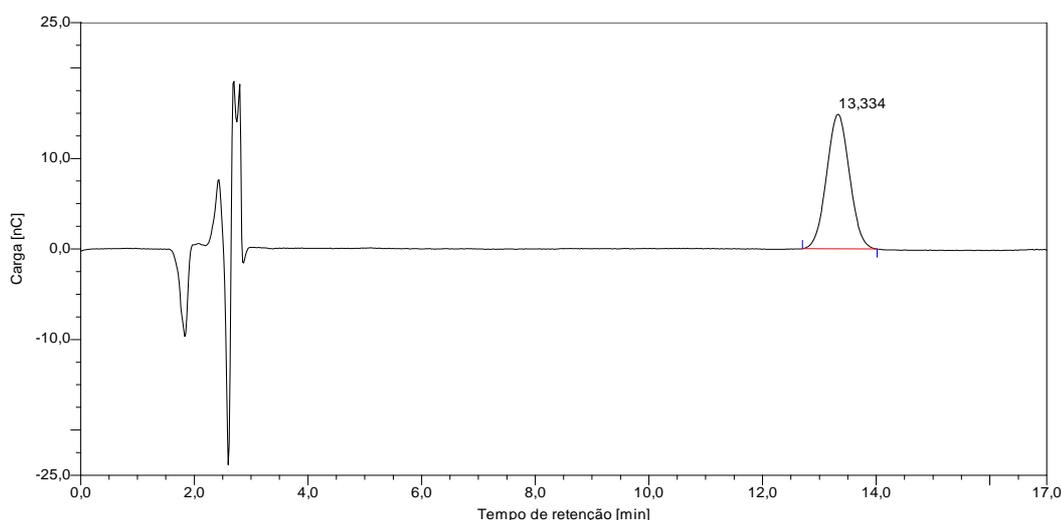


**Figura 4.4** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform B*.

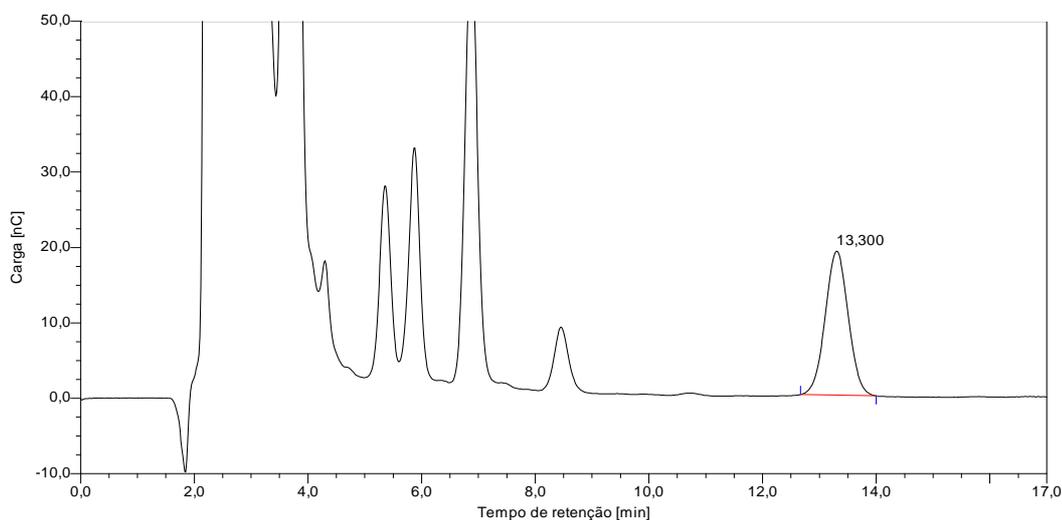


**Figura 4.5** Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform B*. O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse.

As figuras 4.6 e 4.7 apresentam, respectivamente, o perfil cromatográfico da injeção do padrão e de uma amostra de vacina obtidos na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform A*.



**Figura 4.6** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform* A.



**Figura 4.7** Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a *waveform* A. O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse.

A comparação dos cromatogramas obtidos com a injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP (figuras 4.4 e 4.6) e com a injeção de amostras de vacina do lote 084VZF011Z (figuras 4.5 e 4.7) mostra que não houve diferença significativa entre os tempos de retenção verificados nas análises desenvolvidas com as *waveforms* B e A. A fim de avaliar a validade desta suposição, as variâncias nos tempos de retenção médios obtidos em ambas as análises cromatográficas foram primeiramente avaliadas através do teste F. Pela avaliação dos resultados obtidos, procedeu-se com o teste t adequado. Os dados experimentais são apresentados na tabela 4.1, enquanto que na tabela 4.2 é possível observar os resultados do teste F.

**Tabela 4.1** Tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as *waveforms* B e A.

	Tempo de retenção (min)	
	<i>waveform</i> B	<i>waveform</i> A
P1	13,350	13,317
	13,367	13,317
	13,334	13,317
P2	13,350	13,317
	13,367	13,317
	13,350	13,334
P3	13,367	13,334
	13,367	13,334
	13,367	13,334
P4	13,384	13,334
	13,367	13,334
	13,367	13,350
P5	13,367	13,334
	13,400	13,334
	13,384	13,350
Amostra	13,300	13,300
	13,284	13,300
	13,300	13,300
Média	13,354	13,325
Desvio padrão	0,031	0,016
Coeficiente de variação	0,233	0,116
Intervalo de confiança	0,013	0,006

O intervalo de confiança da média apresentado na tabela 4.1 foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Intervalo de confiança} = \bar{x} \pm t_{(n-1)} \left( \frac{s}{\sqrt{N}} \right)$$

Onde  $\bar{x}$  corresponde à média,  $t_{(n-1)}$  é o valor obtido na tabela de áreas de distribuição normal padronizada para  $n-1$  graus de liberdade,  $s$  é o desvio padrão e  $N$  é o tamanho da amostra.

**Tabela 4.2** Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias dos tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as *waveforms* B e A.

	<i>waveform</i> B	<i>waveform</i> A
Média	13,354	13,325
Variância	0,001	0,000
Observações	18	18
Gl	17	17
F		4,021
F crítico uni-caudal		2,272

Os resultados do teste F apresentados na tabela 4.2 demonstram que as variâncias dos tempos de retenção obtidas com as *waveforms* B e A são estatisticamente diferentes a um nível de significância de 5 %, sendo as amostras consideradas heterocedásticas. Neste caso, é recomendada a utilização do teste t para variâncias diferentes, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Onde  $X_1$  e  $X_2$ ,  $S_1$  e  $S_2$  e  $n_1$  e  $n_2$  são, respectivamente, os valores médios, variâncias e tamanhos amostrais obtidos pelas análises cromatográficas com a *waveform* B (1) e com a *waveform* A (2). O número de graus de liberdade (GL) é obtido de acordo com a seguinte equação:

$$GL = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

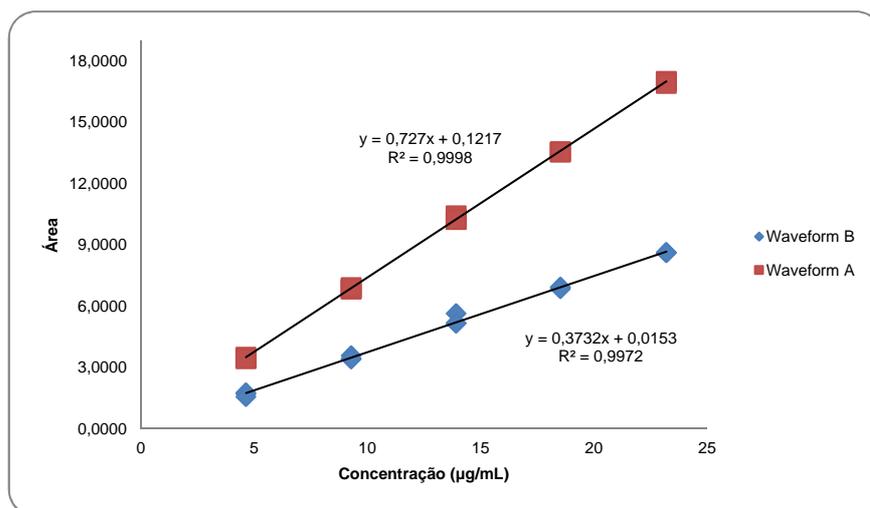
A tabela 4.3 apresenta os resultados do teste t.

**Tabela 4.3** Teste t, assumindo variâncias diferentes dos tempos de retenção obtidos nas análises cromatográficas desenvolvidas com as *waveforms* B e A.

	<i>waveform B</i>	<i>waveform A</i>
Média	13,354	13,325
Variância	0,001	0,000
Observações	18	18
Hipótese da diferença		0
gl		25
Stat t		3,492
t crítico bi-caudal		2,060

Foi possível verificar que o valor de  $t_{\text{calculado}}$  é maior que o de  $t_{\text{crítico}}$ . Sendo assim, a hipótese nula é descartada, evidenciando que há uma diferença estatística entre os dois resultados, ao nível de 5 % de significância. Entretanto, como foram utilizados preparos distintos de fase móvel inter-corridas, esta diferença nos resultados pode ter sido promovida por este motivo. Sendo assim, não é possível concluir se a *waveform* utilizada interfere ou não no tempo de retenção do analito.

O próximo passo foi verificar se a *waveform* utilizada produziu diferenças significativas na quantificação do polissacarídeo. Para tal, compararam-se os resultados obtidos na determinação do conteúdo de polissacarídeo contido em duas amostras, independentes, de vacina de um mesmo lote (084VZF011Z), calculados em função de suas respectivas curvas analíticas obtidas nas corridas cromatográficas desenvolvidas com a *waveform* B e com a *waveform* A. A figura 4.8 ilustra graficamente as curvas analíticas obtidas com ambas *waveforms*.



**Figura 4.8** Comparação das curvas analíticas obtidas com a *waveform* B e com a *waveform* A.

É importante ressaltar que os pontos da curva analítica (5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL) foram designados de acordo com a concentração teórica do material de referência (500 µg/mL) para simplificar a escrita. Entretanto, para efeito de cálculo, esses valores foram corrigidos, de acordo com a concentração nominal descrita no certificado do material de referência que é de 464 µg/mL. A tabela 4.4 apresenta a correção dos valores de concentração.

**Tabela 4.4** Valores corrigidos dos pontos da curva analítica, baseados na concentração nominal descrita no certificado do material de referência de PRP.

	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração nominal (µg/mL)
P1	5,0	4,64
P2	10,0	9,28
P3	15,0	13,92
P4	20,0	18,56
P5	25,0	23,20

O material de referência, utilizado neste trabalho como padrão para curva analítica foi elaborado *in house* e preparado a partir de PRP produzido no Departamento de Vacinas Bacterianas (DEBAC) de Bio-Manguinhos. A justificativa para a diferença entre a concentração esperada e a nominal verificada em seu certificado é que como o PRP é um polímero sólido de difícil partição, o que dificulta o processo de preparo de amostras individuais, Rodrigues (2009) optou por obter uma solução aquosa, preparada com o PRP submetido a uma etapa de secagem que, conseqüentemente, levou à perda de massa, sendo necessário recalcular a concentração final da solução.

Com os valores de concentração da curva analítica corrigidos, foi possível determinar a concentração de polissacarídeo, em  $\mu\text{g/mL}$ , contido nas amostras de vacina. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.5. O nível de significância utilizado no cálculo do intervalo de confiança da média foi de 5 %.

**Tabela 4.5** Resultados da concentração de PRP na amostra de vacina, lote 084VZF011Z, determinados em função das curvas analíticas obtidas com as *waveforms* B e A.

Determinação	Concentração obtida ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>waveform</i> B	<i>waveform</i> A
1	12,21	12,16
2	12,32	12,29
3	12,37	12,21
Média	12,30	12,22
Desvio padrão	0,08	0,07
Coefficiente de variação	0,67	0,55
Intervalo de confiança	0,14	0,11

A análise dos resultados obtidos sugere que não há uma diferença significativa entre as concentrações de polissacarídeo determinadas nas corridas cromatográficas desenvolvidas com as *waveforms* B e A. Entretanto, analogamente ao tratamento dos dados relativos ao tempo de retenção, as variâncias das concentrações foram avaliadas através do teste F e do respectivo teste t. A tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos para o teste F.

**Tabela 4.6** Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias das concentrações determinadas em função das curvas analíticas obtidas com as *waveforms* B e A.

	<i>waveform</i> B	<i>waveform</i> A
Média	12,30	12,22
Variância	0,01	0,00
Observações	3	3
gl	2	2
F		1,507
F crítico uni-caudal		19,00

Diferentemente do que foi observado no caso dos tempos de retenção, o valor encontrado para  $F_{\text{calculado}}$  é menor que o  $F_{\text{crítico}}$ , o que permite concluir que as variâncias dos dois valores médios são comparáveis, isto é, homocedásticas, a um nível de significância de 5 %. Neste caso, é recomendada a utilização do teste t para variâncias equivalentes, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Neste caso,  $s$  representa o desvio padrão agrupado, uma vez que ambos os desvios-padrão das duas médias são equivalentes, e pode ser calculado da seguinte forma:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Além disso, o número de graus de liberdade (GL) a ser aplicado no teste t é obtido simplesmente por:

$$GL = (n_1 + n_2) - 2$$

Os resultados do teste t estão apresentados na tabela 4.7.

**Tabela 4.7** Teste t, assumindo variâncias equivalentes para os resultados obtidos com as curvas analíticas das *waveforms* B e A.

	<i>waveform</i> B	<i>waveform</i> A
Média	12,30	12,22
Variância	0,01	0,00
Observações	3	3
Variância agrupada	0,0056	
Hipótese da diferença	0	
gl	4	
Stat t	1,344	
t crítico uni-caudal	2,132	

A interpretação do resultado do teste t elucidada que, a um nível de significância de 5 %, não foi possível evidenciar diferença estatística significativa entre os dois resultados. Sendo assim, a hipótese nula é mantida, isto é,  $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ , logo é possível concluir com o mesmo nível de confiança, que a *waveform* utilizada não interfere na quantificação do analito.

Embora não exista diferença estatística para a quantificação, o mesmo não é verificado quanto à sensibilidade. A comparação entre as curvas analíticas obtidas em ambas as análises cromatográficas (figura 4.8) permite concluir que a curva referente à *waveform* A possui uma inclinação acentuadamente maior, já que a diferença entre seu coeficiente angular e o da curva da *waveform* B é de 51,3 %. Em virtude deste resultado, e mediante ao sugerido na nota técnica 21 da Dionex (1998), se justifica a utilização da *waveform* A como critério para incrementar a sensibilidade do método.

Outro importante fator para a utilização da *waveform* A diz respeito ao desgaste do eletrodo. Com a introdução desta *waveform* no método, não foi exigida a troca do eletrodo de trabalho ao longo da realização de todos os experimentos necessários para o cumprimento deste trabalho, os quais foram realizados concomitantemente com as análises de rotina (aproximadamente seis meses).

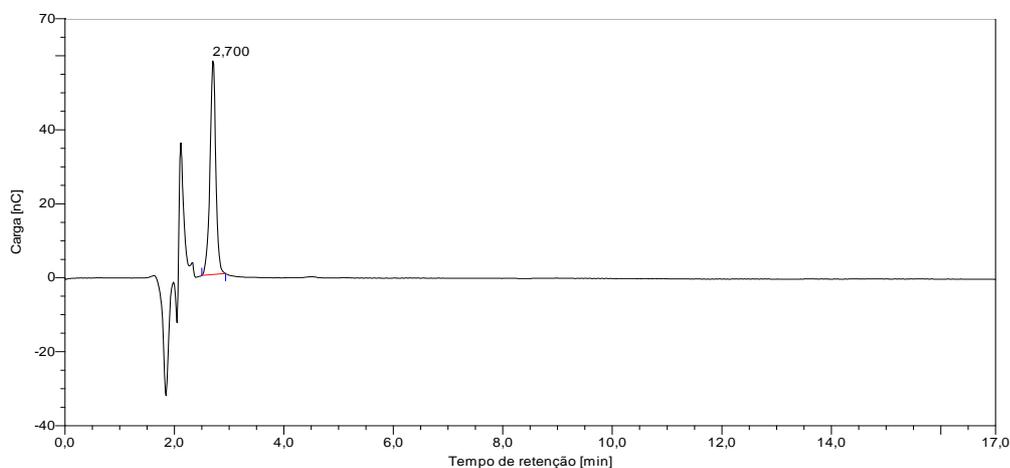
#### 4.1.2 Tempo de retenção

O tempo de retenção pode ser definido como o tempo transcorrido desde a injeção da amostra no sistema até a obtenção da altura máxima de um pico, levando-se em conta o volume existente entre o injetor e o detector (volume morto).

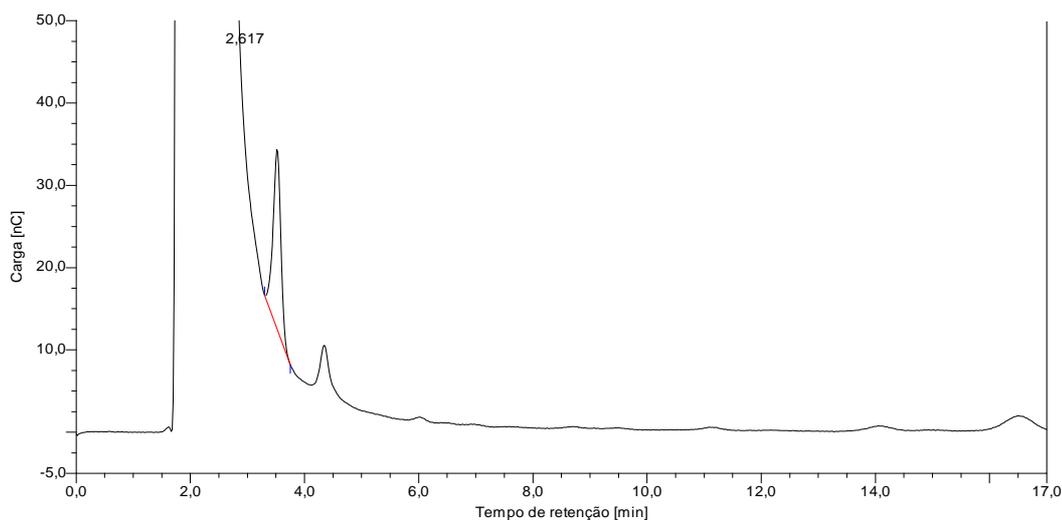
A otimização do tempo de retenção pode ser feita variando-se as propriedades da fase móvel ou da fase estacionária. Neste trabalho, buscou-se variar a fase móvel, por ser a opção mais econômica e viável. As modificações na concentração dos componentes da fase móvel foram realizadas com o objetivo de reduzir o tempo de retenção do pico de PRP, sem detrimento de resolução cromatográfica.

Na CLAE por troca aniônica, uma modificação no valor do pH em direção ao ponto isoelétrico de uma das substâncias-amostra causa a diminuição da carga-líquida, diminuindo a retenção do analito sobre a fase estacionária, assim como a força iônica da fase móvel pode ser ajustada para obter uma eluição mais lenta ou mais rápida do analito de interesse. Diminuindo-se a força iônica, a competição pelos grupos carregados da fase estacionária é mínima e as substâncias são ligadas fortemente a ela. Aumentando-se a força iônica, aumenta-se a competição e reduz-se a interação entre a fase estacionária e as substâncias-amostra, que são assim eluídas, diminuindo o tempo de retenção do analito de interesse (Brites 2005).

Desta forma, para diminuir o tempo de retenção do PRP, que no método não otimizado era de, aproximadamente, 13 minutos, testou-se aumentar o pH e/ou aumentar a força iônica da fase móvel. Estes ajustes foram realizados separadamente para avaliar o efeito de cada um. Primeiramente, os 100 mmol/L de acetato de sódio foram mantidos e aumentou-se a concentração de hidróxido de sódio de 190 mmol/L para 1 mol/L, obtendo-se assim um pH, aproximadamente, 14. Os cromatogramas do padrão e de uma amostra de vacina obtidos com esta fase móvel (Fase I) podem ser vistos nas figuras 4.9 e 4.10.

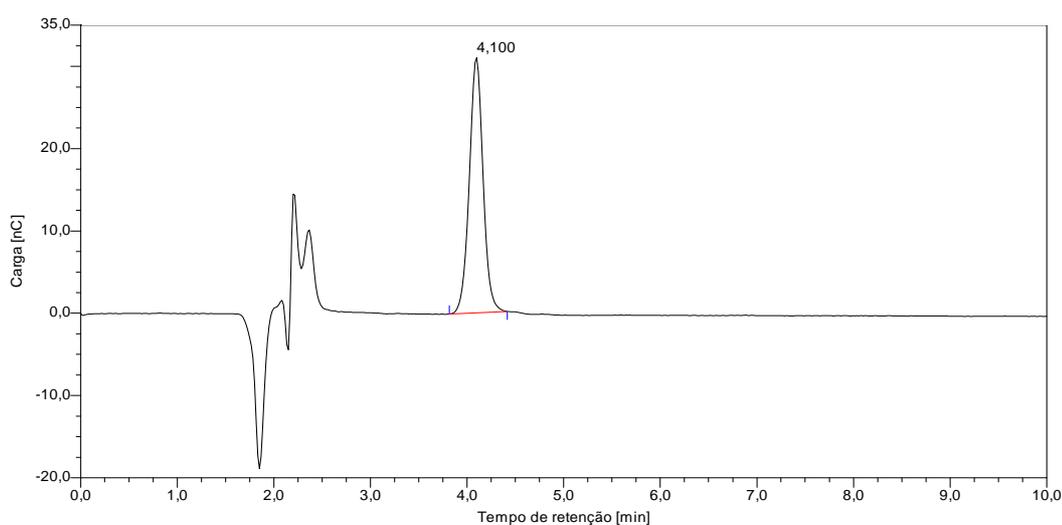


**Figura 4.9** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase I (100 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio).

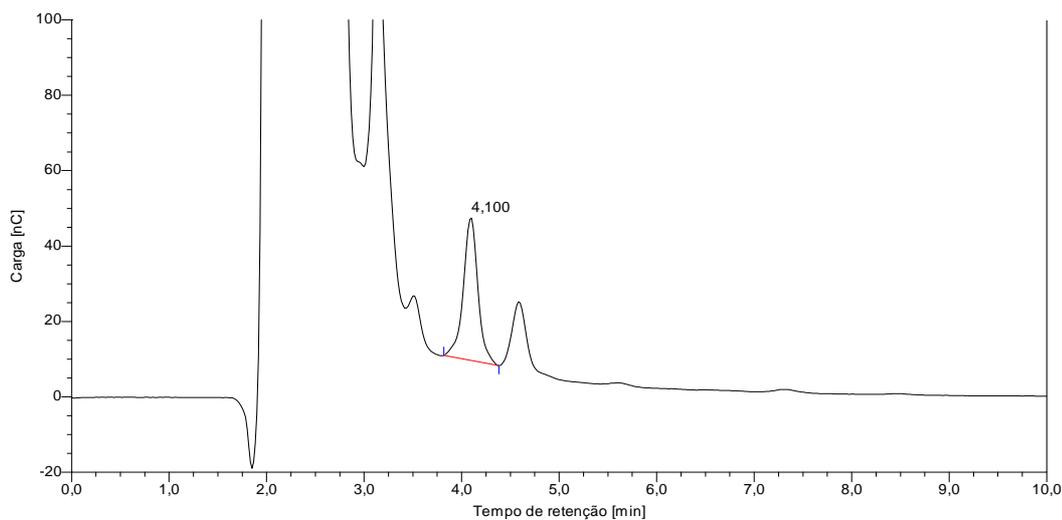


**Figura 4.10** Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase I (100 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse.

Nestas condições, observou-se que a grande diminuição no tempo de retenção levou a eluição do pico de PRP próximo ao  $V_0$ , apresentando parâmetros cromatográficos inadequados, devido à coeluição com outros componentes da matriz. Por isso, a força iônica da fase móvel foi alterada, diminuindo a concentração de acetato de sódio para 0,2 mmol/L e mantendo a concentração de hidróxido de sódio em 1 mol/L. Os cromatogramas do padrão e de uma amostra de vacina obtidos com esta nova solução (Fase II) podem ser vistos nas figuras 4.11 e 4.12.

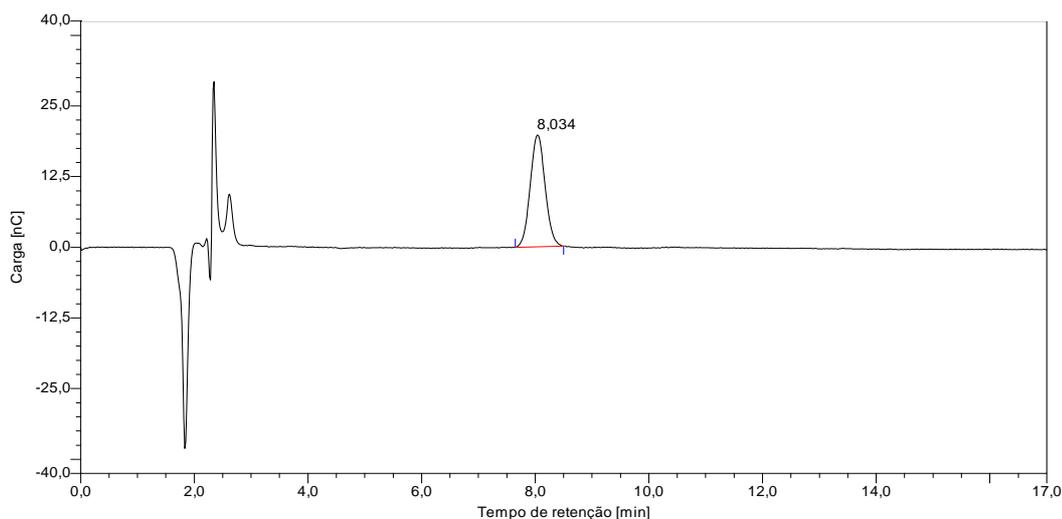


**Figura 4.11** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase II (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio).

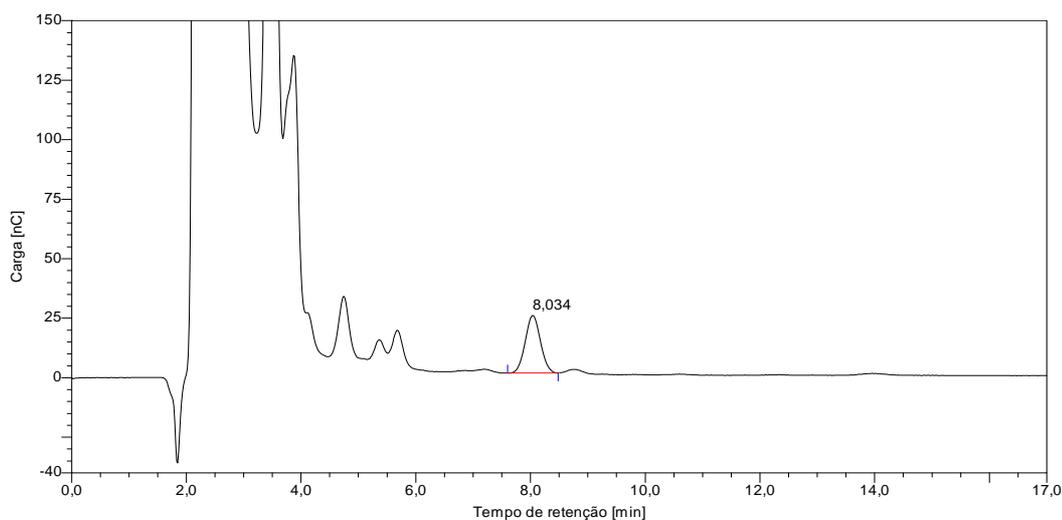


**Figura 4.12** Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase II (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 1 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse.

Analisando os cromatogramas obtidos na injeção de amostra na análise desenvolvida com a Fase II observou-se, ainda, a existência de sobreposição de sinais. Assim, uma nova alteração de fase móvel foi necessária, mantendo os 0,2 mmol/L de acetato de sódio e diminuindo a concentração de hidróxido de sódio para 0,7 mol/L (Fase III). Os cromatogramas do padrão e de uma amostra de vacina obtidos com esta fase móvel podem ser vistos nas figuras 4.13 e 4.14.



**Figura 4.13** Cromatograma da injeção do padrão de 10 µg/mL de PRP, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase III (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 0,7 mol/L de hidróxido de sódio).



**Figura 4.14** Cromatograma da injeção de uma amostra de vacina, obtido na corrida cromatográfica desenvolvida com a Fase III (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 0,7 mol/L de hidróxido de sódio). O cromatograma foi redimensionado para melhor visualização do pico de interesse.

O tempo de retenção obtido na análise cromatográfica desenvolvida com a Fase III (figuras 4.13 e 4.14) foi considerado satisfatório, não sendo observadas quaisquer interferências com relações sinal ruído apreciáveis, próximo ao tempo de retenção de, aproximadamente, oito minutos.

Assim, a Fase III (0,2 mmol/L de acetato de sódio e 0,7 mol/L de hidróxido de sódio) foi a utilizada como fase móvel, proporcionando a otimização do método quanto à retenção e resolução (seletividade) adequadas. Após a otimização, o tempo de corrida foi reduzido de 17 para 12 minutos. A tabela 4.8 apresenta as médias dos tempos de retenção obtidos com as modificações na fase móvel e os compara ao obtido no método não otimizado.

**Tabela 4.8** Médias dos tempos de retenção obtidos nas análises realizadas com as modificações da concentração de acetato de sódio e de hidróxido de sódio na fase móvel.

	Método não otimizado	Fase I	Fase II	Fase III
Acetato de sódio	100 mmol/L	100 mmol/L	0,2 mmol/L	0,2 mmol/L
Hidróxido de sódio	190 mmol/L	1 mol/L	1 mol/L	0,7 mol/L
Tempo de retenção (min)	13,325	2,686	4,093	8,035

### 4.1.3 Hidrólise alcalina

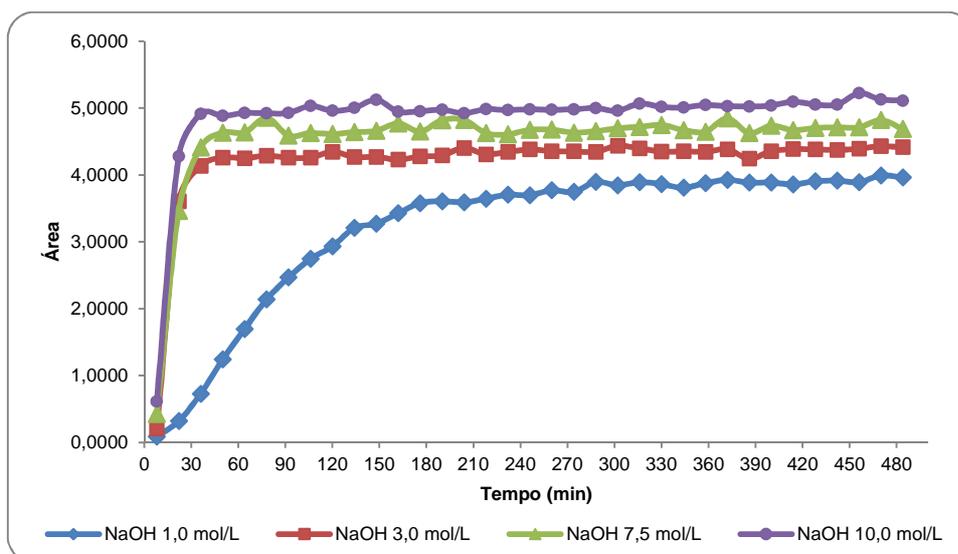
No método implementado no controle de qualidade da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada), as amostras e o padrão são submetidos a uma hidrólise alcalina, promovida com a adição de 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L. Esta etapa tem por finalidade despolimerizar o polissacarídeo em unidades simples de ribose-ribitol-fosfato para a sua determinação, através de detecção amperométrica. Entretanto, nessas condições, a despolimerização do polissacarídeo não se processa imediatamente, sendo recomendado aguardar, no mínimo, 7 horas para iniciar a análise cromatográfica.

Com o objetivo de otimizar esta etapa do método, avaliou-se a concentração de hidróxido de sódio apropriada para promover uma hidrólise mais rápida e eficiente, sem perder sensibilidade. Foram realizados experimentos utilizando, além da concentração de hidróxido de sódio adotada no método implementado, as concentrações de 3,0 mol/L, 7,5 mol/L e 10,0 mol/L.

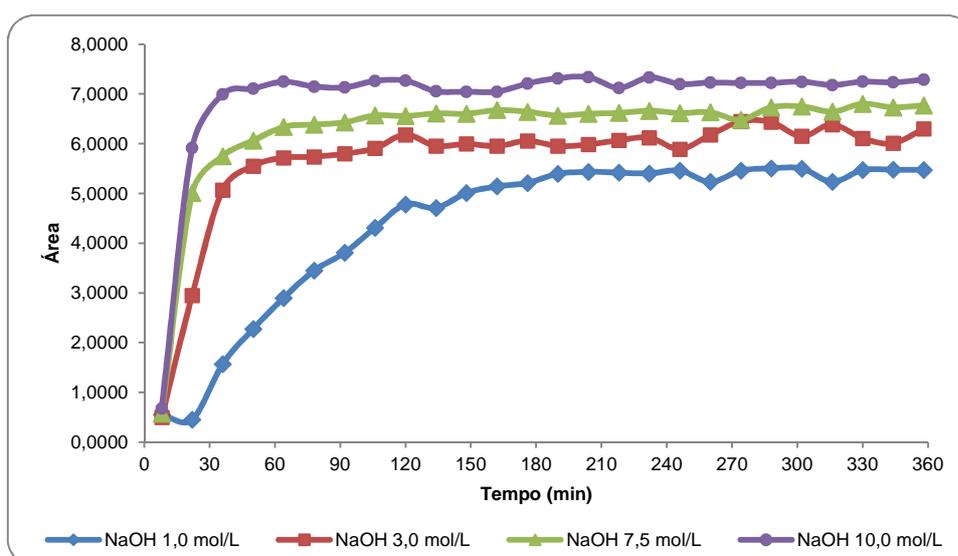
Primeiramente, avaliou-se o material de referência de PRP na concentração de 10 µg/mL, por este ser o limite inferior especificado para o conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada). Foram realizadas quatro corridas independentes, injetando os padrões imediatamente após a adição da solução de hidróxido de sódio, nas referidas concentrações.

De maneira análoga, procedeu-se à análise de amostras de vacina, a fim de verificar se sua matriz poderia interferir na hidrólise do polissacarídeo. Contudo, para que as variações nas áreas dos sinais cromatográficos correspondessem somente à hidrólise, os experimentos com as amostras de vacina foram desenvolvidos utilizando o mesmo preparo de fase móvel.

Os gráficos das figuras 4.15 e 4.16 apresentam a comparação das áreas obtidas para cada concentração, em função do tempo de hidrólise. Como pode ser observado nos gráficos, o aumento da concentração da solução de hidróxido de sódio proporcionou uma diminuição no tempo de hidrólise, com incremento na sensibilidade. Durante o tempo analisado, não foi observada degradação, tanto no padrão, quanto na amostra e não se verificou interferência da matriz.



**Figura 4.15** Variação das áreas dos picos cromatográficos referentes ao padrão de 10 µg/mL de PRP em função do tempo de hidrólise alcalina.



**Figura 4.16** Variação das áreas dos picos cromatográficos referentes à amostra de vacina em função do tempo de hidrólise alcalina.

Por apresentar os melhores resultados, a solução de hidróxido de sódio na concentração de 10,0 mol/L foi adotada para promover a hidrólise, utilizando-se o mesmo volume de solução (0,5 mL) adicionada ao padrão e a vacina no método não otimizado. A efetividade da etapa de hidrólise com esta concentração pode ser observada em função da repetitividade obtida nas áreas dos picos (figuras 4.15 e 4.16), depois de transcorridos 36 minutos de hidrólise, e comprovada por apresentar coeficiente de variação (tabela 4.9) menor que 5 %, como recomenda a ANVISA.

**Tabela 4.9** Média, desvio padrão e coeficiente de variação das áreas obtidas nas análises do padrão e de uma amostra de vacina, hidrolisados com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L, após 36 minutos transcorridos da hidrólise.

	P2	Vacina
Média	4,9772	7,1959
Desvio padrão	0,05	0,10
Coeficiente de variação	1,09	1,32
Intervalo de confiança	± 0,02	0,03

#### 4.1.4 Método otimizado

A tabela 4.10 apresenta, resumidamente, os resultados obtidos na etapa de otimização do método, comparando-os aos parâmetros do método não otimizado.

**Tabela 4.10** Parâmetros antes e após a otimização do método.

Parâmetro	Método não otimizado	Método otimizado	
<i>Waveform</i>	B	A	
Volume de injeção	120 µL	50 µL	
Fase móvel	Acetato de sódio	100 mmol/L	0,2 mmol/L
	Hidróxido de sódio	190 mmol/L	0,7 mol/L
Tempo de retenção	≅ 13 minutos	≅ 8 minutos	
Tempo de corrida	17 minutos	12 minutos	
Hidrólise alcalina	≥ 7 horas	≥ 40 minutos	

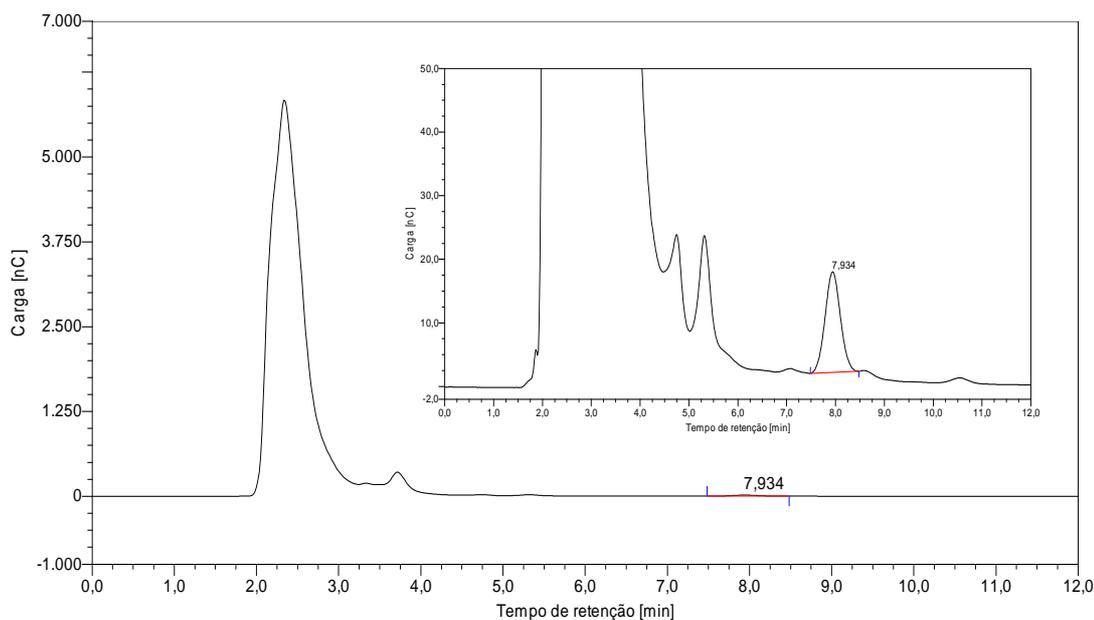
## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

O método para determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) por HPAE-PAD, implantado no LAFIQ, já havia sido validado. Entretanto, em conformidade com a orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (2011), quaisquer ampliações e/ou modificações realizadas em um método normalizado devem ser avaliadas a fim de comprovar que o método otimizado atende às exigências das aplicações analíticas, bem como para assegurar a confiabilidade dos resultados.

Assim, a revalidação do método se fez necessária, avaliando-se os parâmetros de adequação a serem considerados durante a validação de procedimentos analíticos, tanto na orientação do INMETRO, quanto no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA (Brasil 2003).

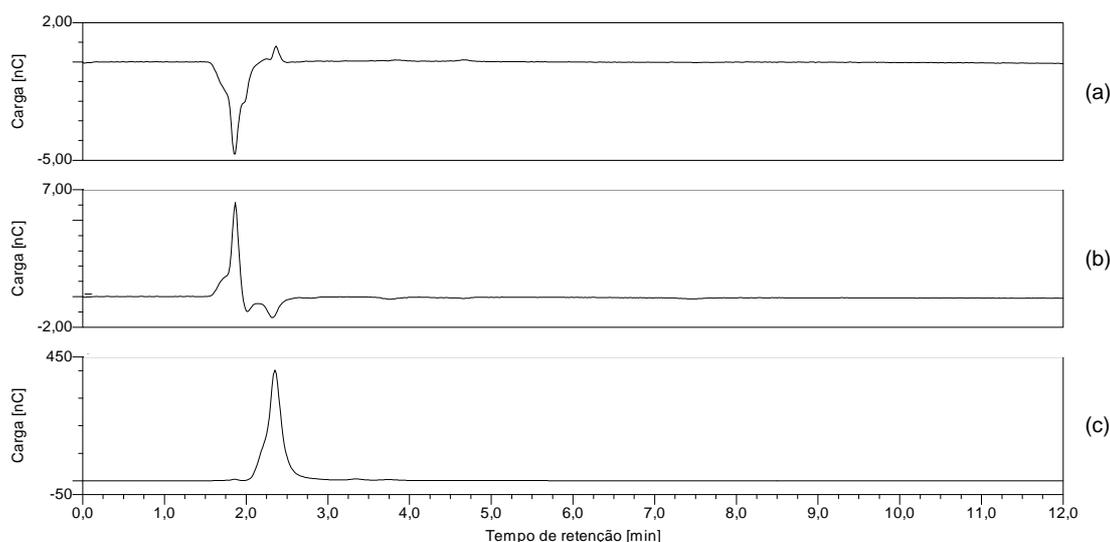
### 4.2.1 Seletividade

A seletividade foi o primeiro parâmetro avaliado para a validação da metodologia proposta. Assim, foi realizada a injeção de uma amostra de vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada). O cromatograma obtido pode ser observado na figura 4.17 onde é possível visualizar o pico de interesse, bem como identificar o seu respectivo tempo de retenção.



**Figura 4.17** Visão geral do cromatograma de uma amostra de vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada). No detalhe, a escala do cromatograma foi modificada para melhor visualização do pico de interesse.

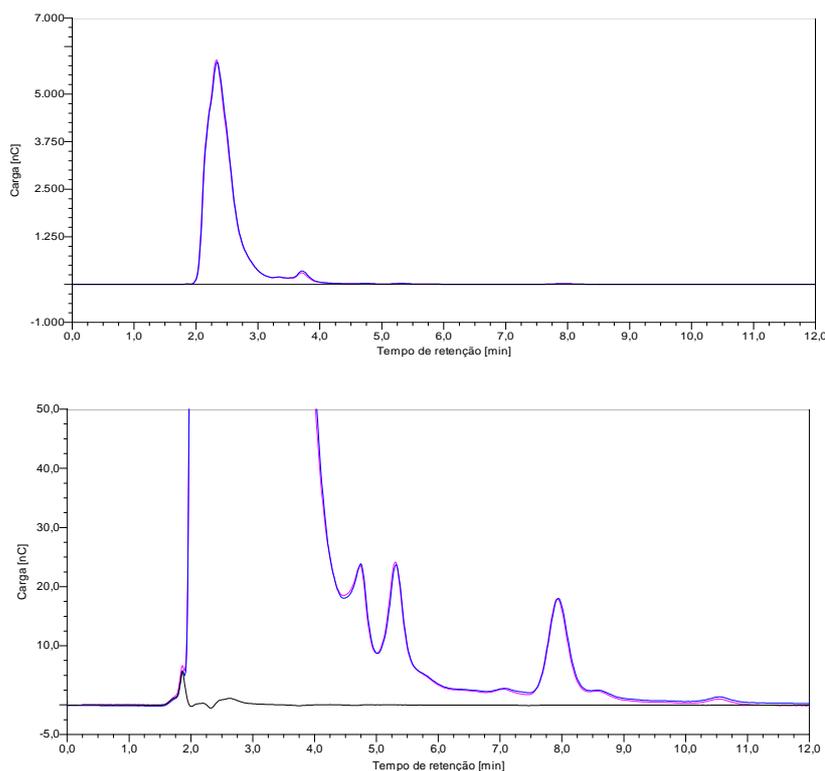
A literatura sugere diferentes maneiras para inferir a capacidade de identificação e/ou determinação do analito de interesse, de forma inequívoca, na amostra a ser analisada. Dentre estas, recomenda-se verificar se a matriz da amostra contém componentes que possam interferir na separação e/ou no tempo de retenção do analito (INMETRO 2011). Desta forma, buscou-se avaliar, qualitativamente, se o diluente e o reagente utilizados para, respectivamente, a reconstituição e preparo da amostra, assim como o excipiente utilizado na formulação, interferiam no desempenho da medição, aumentando ou reduzindo o sinal do pico de interesse (figura 4.18).



**Figura 4.18** Cromatogramas representativos do estudo da seletividade: (a) água, (b) água com adição de solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L e (c) lactose com adição de solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L.

Analisando os cromatogramas da figura 4.18, observou-se a inexistência de sinais coeluentes com o pico principal, com relações sinal-ruído apreciáveis, (próximos a 8 minutos) nas injeções individuais de água (figura 4.18 a), de água com adição de hidróxido de sódio (figura 4.18 b) e de lactose com adição de hidróxido de sódio (figura 4.18 c). Isso sugere que o método apresentou seletividade tanto para o diluente quanto para o excipiente, bem como para o hidróxido de sódio utilizado como reagente para promover a adequabilidade da amostra ao sistema de detecção.

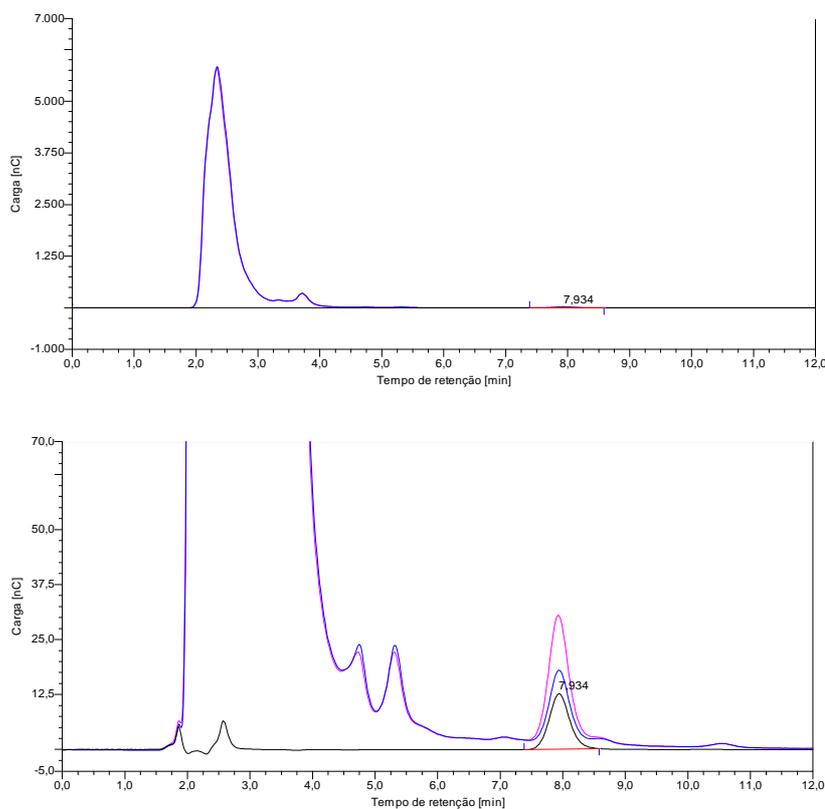
A seletividade também avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo presente na amostra (Ribani 2004). Como já exposto, a vacina *Haemophilus influenzae b* (conjugada) é composta de polissacarídeo conjugado quimicamente à proteína monomérica tetânica (PMT), sendo necessário avaliar se esta acentua ou inibe a detecção e/ou quantificação do polissacarídeo. Para tal, injetou-se uma solução de PMT, tratada com a mesma solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L utilizada no preparo da amostra, uma amostra fortificada com solução de PMT e uma amostra como controle (figura 4.19).



**Figura 4.19** Cromatogramas sobrepostos da solução de PMT tratada com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L (—), adicionada a uma amostra de vacina (—) e, uma amostra de vacina como controle (—). Acima, visão geral; abaixo, escala modificada para melhor visualização do pico de interesse.

Na figura 4.19, pode ser observado que não há picos referentes à PMT próximo ao tempo de retenção do polissacarídeo, quando esta é injetada individualmente. A sobreposição dos cromatogramas também evidencia que a adição de PMT a uma amostra de vacina não modifica a área do pico de interesse, tampouco em seu tempo de retenção. Já que a PMT não contribui para o sinal medido pelo equipamento, o método pode ser considerado seletivo, quando da presença deste outro ingrediente ativo.

Outra forma recomendada pelo INMETRO (2011) de se avaliar a seletividade do método é a realização de ensaios com padrões ou materiais de referência. As análises foram, então, realizadas com o material de referência de PRP, utilizado como padrão para a construção da curva analítica, de maneira análoga aos ensaios realizados com a PMT. Injetou-se uma solução de material de referência de concentração próxima ao valor determinado para a amostra de vacina (tratada com a solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L), uma amostra fortificada com esta solução de material de referencia de PRP e uma amostra como controle (figura 4.20).



**Figura 4.20** Cromatogramas sobrepostos da solução de material de referência de PRP tratada com solução de hidróxido de sódio 10,0 mol/L (—), adicionada a uma amostra de vacina (—) e, uma amostra de vacina como controle (—). Acima, visão geral; abaixo, escala modificada para melhor visualização do pico de interesse.

Em conformidade com o esperado, na injeção do material de referência, utilizado como padrão para a construção da curva analítica, foi observado o sinal cromatográfico referente ao polissacarídeo, no mesmo tempo de retenção obtido para uma amostra de vacina. Através da figura 4.20 observou-se que também houve seletividade significativa na detecção e que a amostra fortificada com o material de referência apresentou um pico correspondente ao somatório da injeção da amostra não fortificada e da injeção do material de referência.

Com base no exposto, o método pode ser considerado seletivo já que foi verificado que o sinal obtido é devido, exclusivamente, ao analito de interesse, o polissacarídeo.

## 4.2.2 Linearidade

Primeiramente, a linearidade do método foi avaliada através dos valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) de cada uma das três curvas analíticas, preparadas independentemente, com três replicatas de cada um dos sete níveis de concentração (figuras 4.21, 4.22 e 4.23).

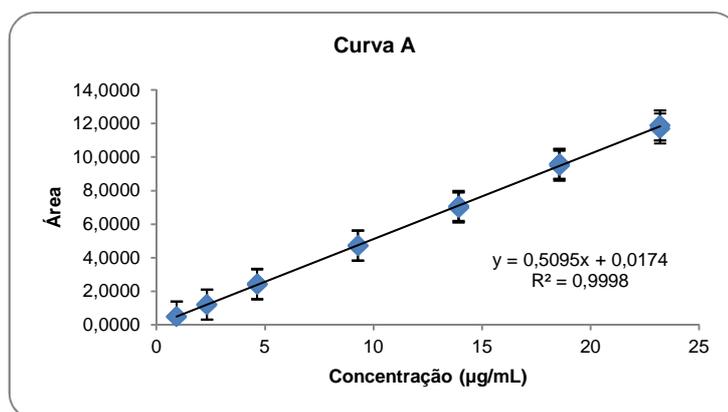


Figura 4.21 Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva A.

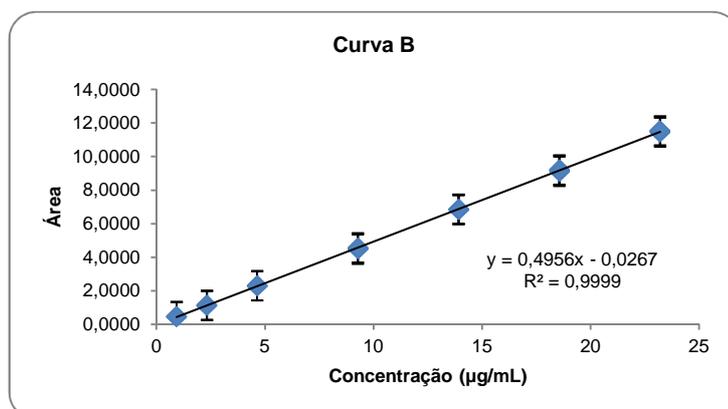


Figura 4.22 Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva B.

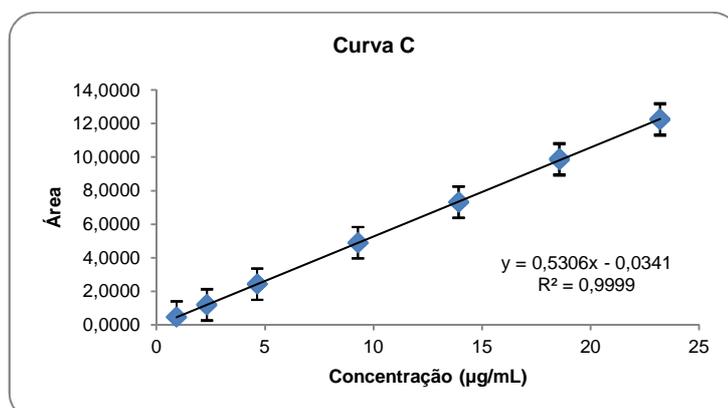


Figura 4.23 Curva analítica obtida para a avaliação da linearidade do método – Curva C.

O guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA (Brasil 2003) determina que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação, cujo mínimo aceitável seja de 0,99. Segundo Cardoso e colaboradores (2010), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), obtido após a regressão pelo método dos mínimos quadrados, corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação ( $r$ ). Nas curvas analíticas obtidas, foram encontrados coeficientes de determinação e de correlação iguais a 0,999, o que atende ao critério estabelecido.

A linearidade do método, na faixa de concentração estudada, foi confirmada, calculando-se os resíduos dos ajustes da curva analítica de acordo com as premissas da tabela desenvolvida por Souza e Junqueira (2005). As médias correspondentes a cada nível de concentração foram plotadas em uma mesma tabela. Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados pelo teste de resíduos padronizados *Jackknife*, onde foram confirmados e retirados três valores extremos. A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner, onde se obteve  $R_{eq}$  (0,98) >  $R_{crit}$  (0,95). A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados demonstrou homocedasticidade, a estatística  $t$  de Levene não foi significativa ( $p > 0,05$ ), apresentando  $t_L$  calculado (-1,77) inferior ao  $t_{tabelado}$  (2,12). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson, onde  $d_{calculado}$  (3,08) >  $d_U$  (limite superior 1,42). A análise de variância (ANOVA) permitiu concluir que houve significância da regressão, pela obtenção de  $p < 0,001$  ( $1,30 \times 10^{-25}$ ), e desvio da linearidade não significativo, pela obtenção de  $p > 0,05$  ( $9,69 \times 10^{-1}$ ). O método está livre de tendência (valor  $p$  da intercepção > 0,05). O resumo das premissas para a curva analítica encontra-se em planilha adaptada de Souza e Junqueira (2005) no Anexo.

#### 4.2.3 Intervalo

A curva analítica proposta para o método de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) foi construída no intervalo de 1 a 25  $\mu\text{g/mL}$ , de forma que a concentração teórica de polissacarídeo (no mínimo, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) estivesse no centro do intervalo linear. Nesta faixa, a incerteza relativa aos pontos experimentais é menor. Tendo sido considerada como satisfatória a linearidade obtida por ela, foi possível concluir que o intervalo mínimo exigido, determinado de acordo com o estabelecido pela ANVISA para

determinações quantitativas, de 80 (2 µg/mL) a 120 % (22 µg/mL) da concentração teórica, foi totalmente contemplado e, por isso, igualmente linear.

#### 4.2.4 Precisão

##### 4.2.4.1 Repetitividade (precisão intra-corrída)

A repetitividade do método foi avaliada pelo coeficiente de variação das seis determinações obtidas pelo analista identificado como analista 1, realizadas no mesmo dia, com o mesmo equipamento e sob as mesmas condições de análise. Os resultados obtidos pelo analista 1 estão apresentados na tabela 4.11.

**Tabela 4.11** Resultados do ensaio de repetitividade realizado pelo analista 1.

Determinação	Concentração (µg/mL)
1	10,76
2	10,91
3	10,87
4	10,72
5	10,89
6	10,91
Média	10,84
Desvio padrão	0,08
Coeficiente de variação	0,76
Intervalo de confiança	± 0,07

O coeficiente de variação das seis injeções da amostra (0,76 %) foi considerado satisfatório, pois se apresenta abaixo do valor de 5 % recomendado no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA para as precisões intra-corrída.

##### 4.2.4.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrídas)

A precisão intermediária do método foi determinada dias depois, por um segundo analista, identificado como analista 2. O analista 2 repetiu o mesmo procedimento executado pelo analista 1. Os resultados obtidos pelos dois analistas estão apresentados na tabela 4.12.

**Tabela 4.12** Resultados dos ensaios de precisão intermediária realizados pelos analistas 1 e 2.

Determinação	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Analista 1	Analista 2
1	10,76	10,92
2	10,91	10,83
3	10,87	10,94
4	10,72	10,90
5	10,89	11,03
6	10,91	10,98
Média	10,84	10,93
Desvio padrão	0,08	0,07
Coeficiente de variação	0,76	0,61
Intervalo de confiança	$\pm 0,07$	$\pm 0,06$

A tabela 4.13 apresenta os valores totais obtidos pelos dois analistas. O coeficiente de variação total igual a 0,79 % obtido foi bem aquém dos 5 %, que é o valor máximo preconizado pela ANVISA.

**Tabela 4.13** Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos resultados obtidos pelos analistas 1 e 2 para o ensaio de precisão intermediária.

Média total	10,89
Desvio padrão total	0,09
Coeficiente de variação total	0,79
Intervalo de confiança	$\pm 0,05$

Para uma avaliação mais criteriosa, os resultados obtidos pelos dois analistas também foram avaliados estatisticamente. Primeiramente, aplicou-se o teste F nas variâncias, para verificar se as mesmas eram estatisticamente comparáveis (tabela 4.14).

**Tabela 4.14** Teste F, com 5 % de significância, realizado nas variâncias das concentrações determinadas em função das curvas analíticas obtidas pelos analistas 1 e 2.

	Analista 1	Analista 2
Média	10,84	10,93
Variância	0,01	0,00
Observações	6	6
gl	5	5
F		1,51
F crítico uni-caudal		5,05

Os resultados do teste F demonstraram que as variâncias das concentrações obtidas pelos dois analistas podem ser consideradas homocedásticas, isto é, não há diferença estatística significativa entre elas, a um nível de significância de 5 %.

Neste caso, é recomendada a utilização do teste t para variâncias equivalentes, cujos resultados estão apresentados na tabela 4.15.

**Tabela 4.15** Teste t, assumindo variâncias equivalentes para os resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, com 5 % de significância.

	Analista 1	Analista 2
Média	10,84	10,93
Variância	0,01	0,00
Observações	6	6
Variância agrupada		0,01
Hipótese da diferença de média		0
gl		10
Stat t		2,06
t crítico bi-caudal		2,23

A interpretação do resultado do teste t permitiu concluir que, a um nível de significância de 5 %, não foi possível evidenciar diferença estatística significativa entre os resultados obtidos pelos analistas 1 e 2, uma vez que  $t_{\text{calculado}}$  é menor que  $t_{\text{crítico}}$ . Logo, foi possível concluir que, independentemente do analista, o método apresentou uma precisão bastante significativa.

#### 4.2.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados a partir das médias correspondentes a cada nível de concentração das três curvas analíticas. Seus valores foram determinados através da planilha *de avaliação de linearidade de curva analítica* elaborada por Souza e Junqueira (2005) (ANEXO). Os limites verificados para o método são, respectivamente, 0,56 µg/mL e 1,66 µg/mL.

#### 4.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através de um ensaio de recuperação, seguindo a orientação do INMETRO (2011). As amostras de vacina foram fortificadas com quantidades conhecidas de material de referência de PRP, em quatro níveis de concentração: 10, 20, 30 e 40 %. As recuperações, descritas na tabela 4.16, foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

Onde  $C_1$  corresponde à concentração do analito na amostra fortificada,  $C_2$  é a concentração do analito na amostra não fortificada e  $C_3$  equivale à concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

**Tabela 4.16** Resultados do ensaio de recuperação realizado em quatro amostras independentes de vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada).

Nível de fortificação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	Taxa de recuperação (%)
10%	12,13	12,12	99
20%	13,29	13,33	102
30%	14,45	14,41	99
40%	15,61	15,57	99

A recuperação média obtida foi de  $(100 \pm 2)$  %, demonstrando que o método otimizado é exato para a determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada).

#### 4.2.7 Robustez

Na inviabilidade de se avaliar a robustez do método analítico em outro equipamento e/ou com colunas analíticas diferentes, durante seu desenvolvimento, os fatores considerados potencialmente críticos foram: *waveform* de trabalho, pH da fase móvel, tempo de hidrólise e o operador. O intuito de verificar cada um destes fatores foi comprovar se pequenas alterações no procedimento podem, ou não, afetar o desempenho do método.

Quanto à susceptibilidade do método à *waveform* de trabalho, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas para a quantificação do polissacarídeo, embora, a utilização da *waveform* A tenha promovido maior sensibilidade.

A variação no pH e da força iônica da fase móvel, obtida com a modificação na concentração de acetato de sódio e de hidróxido de sódio em sua composição, levou à obtenção de diferentes tempos de retenção do analito de interesse (2,686; 4,093; 8,035 e 13,325 min). Foi constatado que, dependendo do tempo de retenção obtido, a separação e a resolução cromatográfica eram comprometidas, devido à coeluição.

Com relação ao tempo de hidrólise, foi verificado que, dependendo da concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada (1,0; 3,0; 7,5 ou 10,0 mol/L), foi necessário um controle no tempo entre o momento em que a solução é adicionada às amostras e aos padrões e o início da análise cromatográfica. Este controle foi indispensável para que as injeções fossem realizadas somente após a total despolimerização do polissacarídeo, visto que quanto mais concentrada a solução de hidróxido de sódio, mais rapidamente a hidrólise se processou.

No que diz respeito ao operador, analistas diferentes realizaram a execução do método analítico, com preparos independentes de fase móvel, curva analítica e amostra. As variâncias das médias das concentrações obtidas por cada analista foram avaliadas através de testes estatísticos. Foi comprovado que não houve qualquer influência do analista que executa as análises cromatográficas nos resultados obtidos.

#### 4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO SINAL QUANTIFICADOR

Com o objetivo de obter informações sobre a identidade do pico utilizado na quantificação do fosfato de poliribosilribitol, após clivagem em meio fortemente alcalino, uma fração correspondente ao sinal foi coletada, manualmente, tomando como base o tempo de retenção.

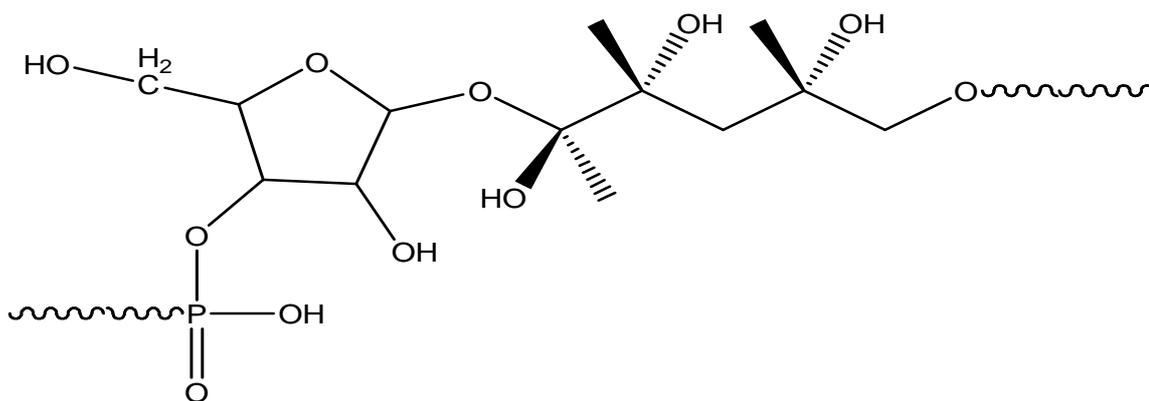
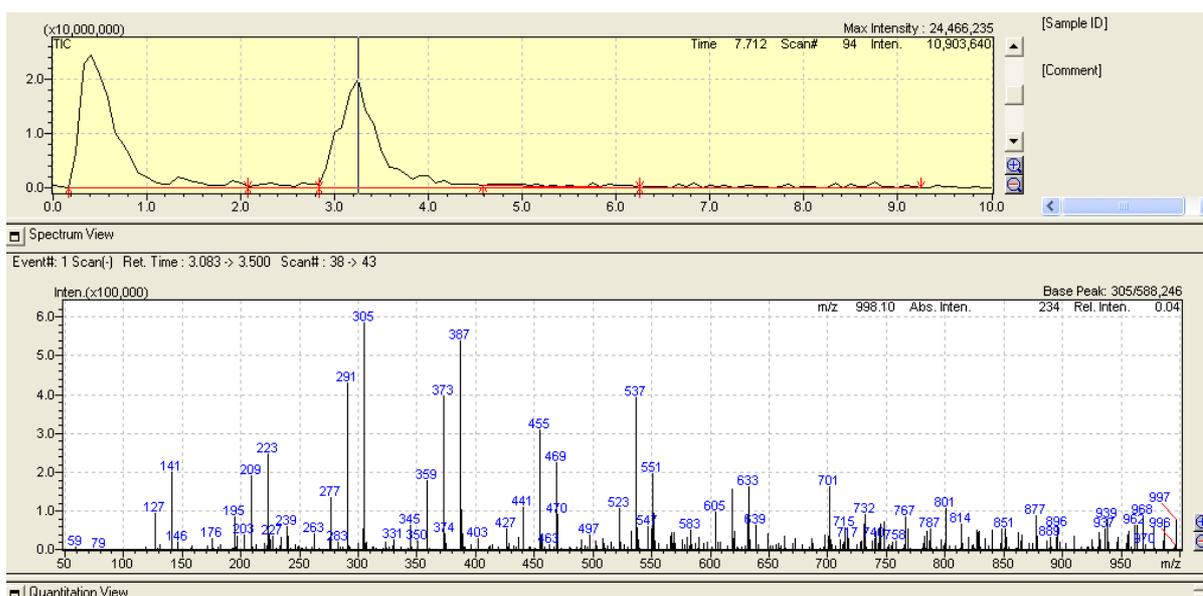


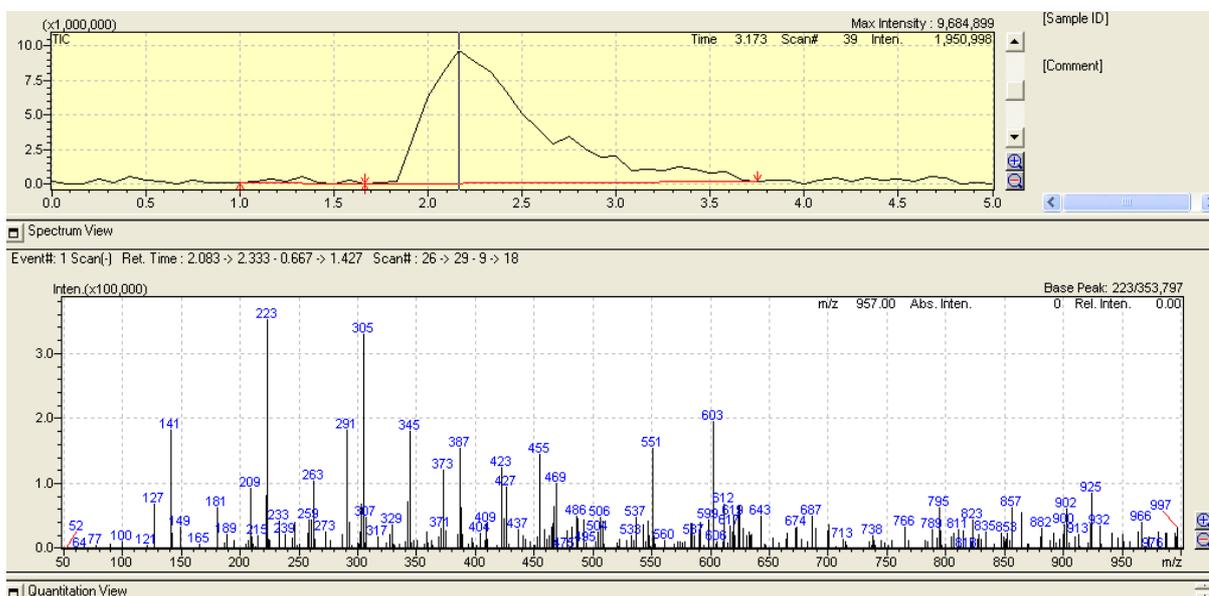
Figura 4.24 Unidade de PRP.

A seguir, o composto purificado foi submetido à análise por cromatografia a líquido, com inserção direta, acoplada à espectrometria de massas, com interface electrospray, em modo de varredura. Por razões estruturais, optou-se pela ionização em modo negativo. Foram utilizadas duas condições de fragmentação, com dois valores de voltagem de dissociação induzida por colisão diferentes: baixo ( $Q_{array} = -5$  volts), visando à captação de informações sobre a molécula desprotonada, no caso  $[M-H]^-$  e, o outro, alto ( $Q_{array} = -80$  volts) visando compreender a fragmentação.

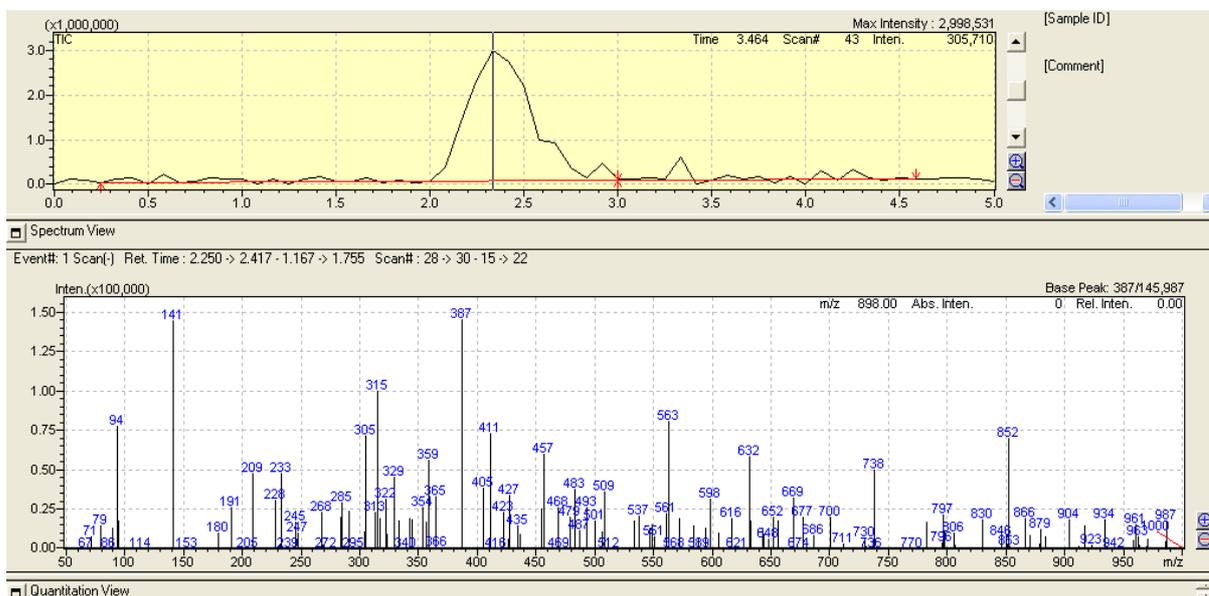
Inicialmente, utilizou-se como fase móvel, uma solução de acetato de amônio 10 mmol/L, que fornece um valor de pH em torno de 7, teoricamente, mais conveniente para ionização em modo negativo. Como foi observada uma periodicidade na fragmentação, com perdas de 14 e 82, que podem ser visualizadas desde 127 e 141, até os fragmentos 701 e 715 do espectro de massas da figura 4.25, optou-se por experimentar outra fase móvel, contendo somente água deionizada. O objetivo da alteração foi confirmar, ou não, com valores de voltagem mais altos, a formação de adutos ou agregados iônicos (*clusters*) com a fase móvel. Como o perfil de fragmentação do espectro de massas com água como fase móvel (figura 4.26), foi similar, embora com uma intensidade de ionização menor segundo os cromatogramas iônicos, esta hipótese foi descartada, sugerindo que o perfil era mesmo desta forma.



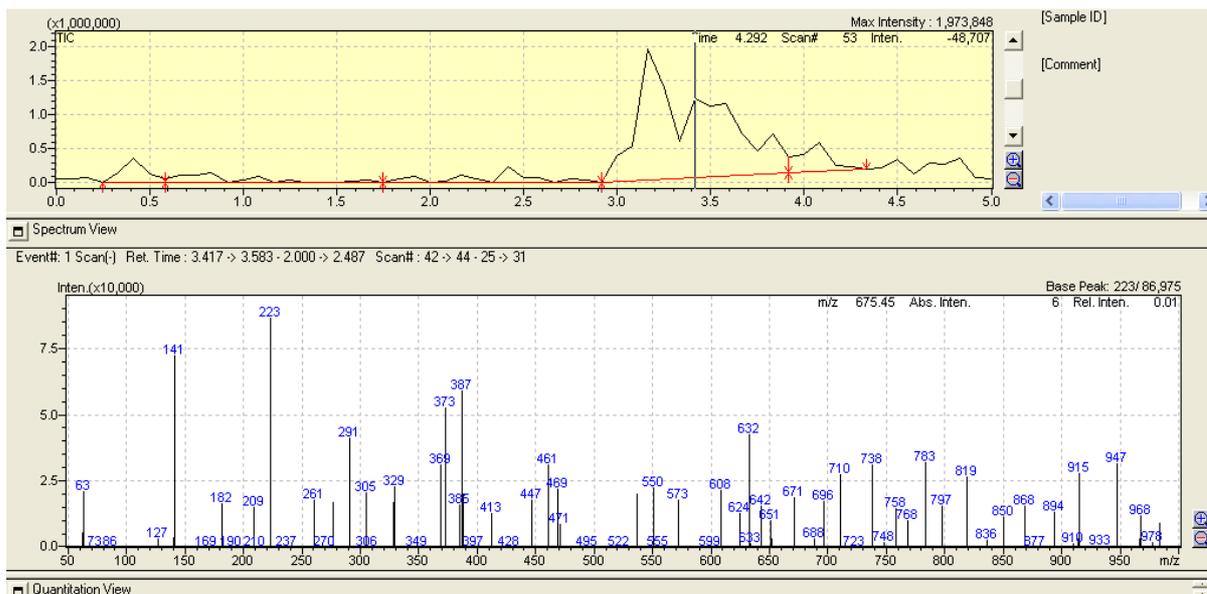
**Figura 4.25** Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo.  $Q_{array} = -5$  volts RF 150 volts. Fase móvel: solução 10 mmol/L de acetato de amônio.



**Figura 4.26** Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray - 5 volts RF 150 volts. Fase móvel: água deionizada.



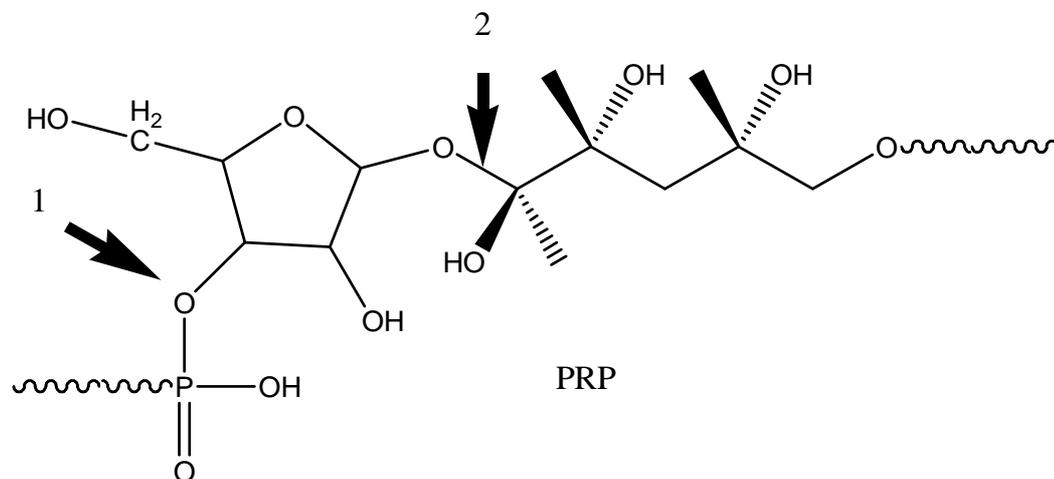
**Figura 4.27** Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray - 80 volts RF 150 volts. Fase móvel: solução 10 mmol/L de acetato de amônio.



**Figura 4.28** Espectro CLAE/EM/ESI em modo negativo. Qarray - 80 volts RF 150 volts. Fase móvel: água deionizada.

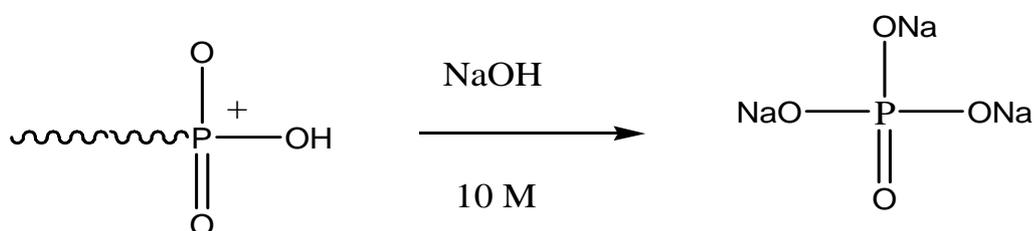
Após confrontar os resultados com os espectros de alta fragmentação, figuras 4.27 e 4.28, com solução de acetato de amônio 10 mmol/L e água, respectivamente, e levando-se em conta que a hidrólise do polissacarídeo foi feita em meio extremamente alcalino, 10 mol/L, chegou-se às seguintes conclusões:

1) Após a despolimerização, os pontos de clivagem de cada unidade monomérica mais prováveis são nos heteroátomos, sem o rompimento do anel da ribose, formado por interação intramolecular em soluções aquosas (figura 4.29).



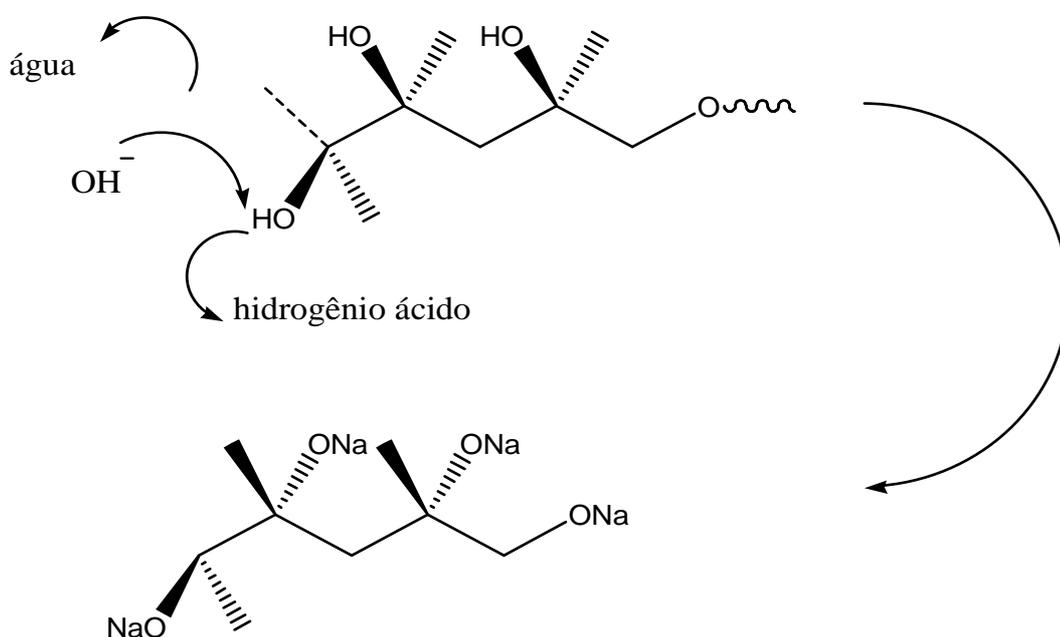
**Figura 4.29** Previsão de clivagem do monômero

2) Também, no ponto de quebra 1, seria mais provável uma regeneração do fosfato, na forma de fosfato trissódico ( $pK_{a3} = 13$ ), devido à alta concentração oxidriliônica, em torno de 10 mol/L, aliado ao fato do átomo de fósforo estar, neste caso, deficitário de elétrons, ou seja, com uma carga formal positiva (figura 4.30).



**Figura 4.30** Regeneração do fosfato para a forma de fosfato trissódico.

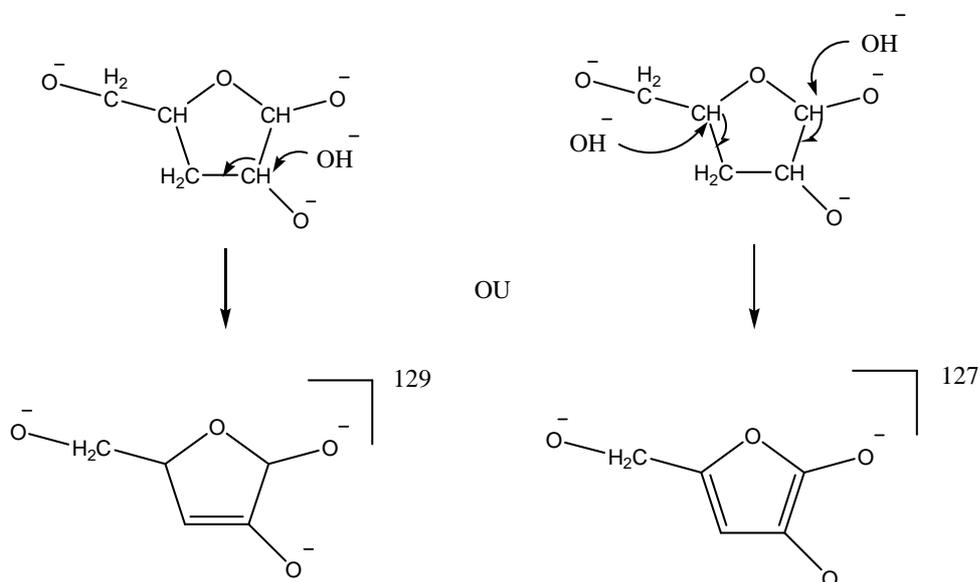
3) Já no ponto de clivagem 2, em meio fortemente alcalino, haveria clivagem na ponte com oxigênio e o ribitol abandonaria a estrutura conforme o esquema da figura 4.31.



**Figura 4.31** Clivagem na ponte com oxigênio e liberação do ribitol da estrutura.

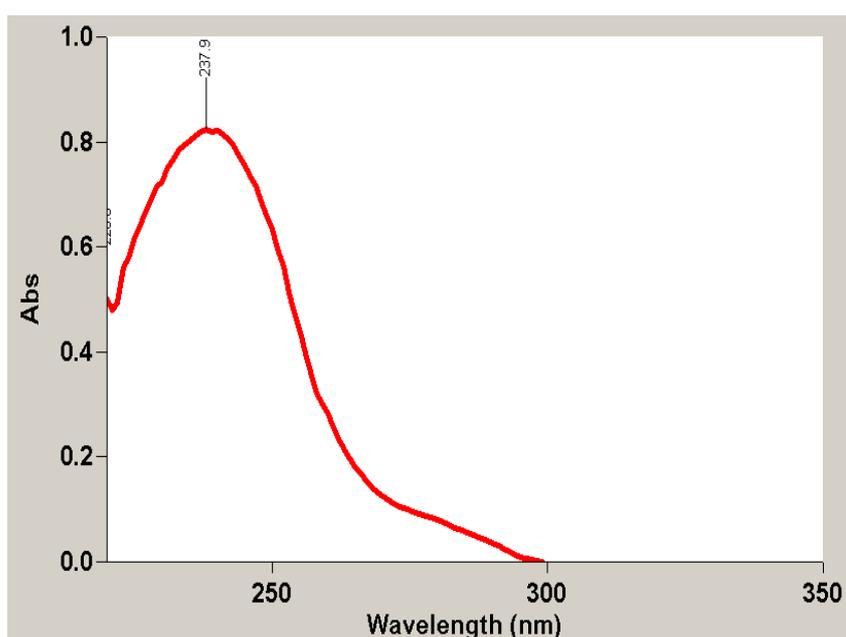
Os álcoois reagem como ácidos, frente a uma base forte, doando o  $H^+$  para a formação de água. Como o oxigênio do grupo  $CH_2O^-$  fica com uma valência livre, o sódio, que está deficitário em elétron, se liga ao oxigênio numa ligação iônica.

4) Através da análise de uma solução de ribose, nas condições otimizadas neste trabalho, foi observado que o tempo de retenção do sinal correspondente não coincidiu com o do sinal quantificador. Portanto, não se trata da mesma substância. Com o meio fortemente básico, há a possibilidade de ataque aos prótons ácidos formando insaturação, conforme o esquema da figura 4.32.



**Figura 4.32** Formação de insaturação.

Há uma forte evidência que haja a formação de insaturação ou insaturações, como pode ser visualizado através do espectro de absorção molecular no UV do pico coletado (figura 4.33).

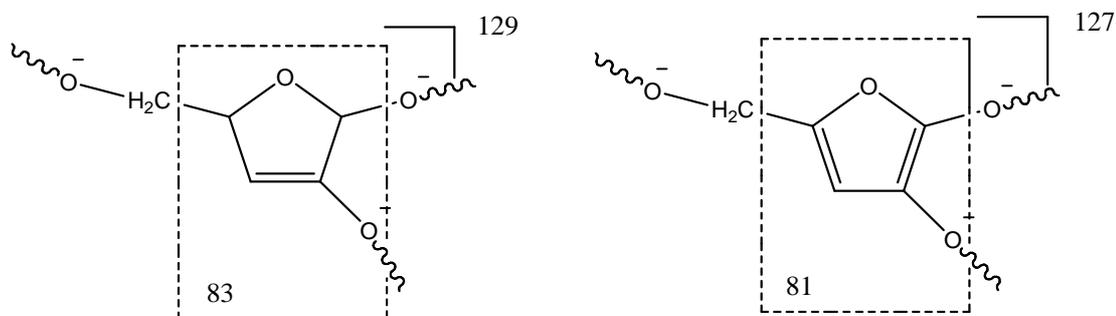


**Figura 4.33** Espectro UV do sinal do cromatograma CLAE-DAP purificado.

A banda de absorção observada, com um máximo em 238 nm, contrasta com o esperado para os monossacarídeos e carboidratos em geral, que só absorvem fortemente abaixo de 190 nm.

Para que as evidências sejam reforçadas, há necessidade futura de realizar uma coleta do sinal em que se obtenha mais massa do material, possibilitando a obtenção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ -DEPT, além de FTIR.

Quanto à estrutura do composto em si, somente com os dados espectrométricos, não se pode afirmar que, como mostra o espectro da figura 4.25, as 8 (ou mais) unidades de fragmento de massa 127 [M-1], existem dessa forma, formando um agrupamento ligado por ligações glicosídicas, tal como um oligossacarídeo (2 a 10 unidades) ou se esse agrupamento é formado na fonte de ionização (figura 4.34).



**Figura 4.34** Elucidação estrutural

## 5 CONCLUSÕES

O método cromatográfico de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) foi otimizado quanto à retenção e resolução adequadas. A mudança na *waveform* de trabalho promoveu maior sensibilidade, reprodutibilidade e menos desgaste do eletrodo de trabalho, reduzindo os gastos com a sua troca. A alteração da composição da fase móvel permitiu boa separação, com alta sensibilidade, em um tempo de corrida de 12 minutos.

Mediante as vantagens apresentadas pelo método otimizado, a etapa de pré-tratamento das amostras se destaca. Os incrementos na concentração da solução de hidróxido de sódio conduziram a uma hidrólise mais rápida e eficiente, promovendo ganhos tanto em relação ao tempo de espera para a hidrólise se processar, quanto na sensibilidade observada nas análises cromatográficas. Com a redução do tempo de hidrólise, de 7 horas para 40 minutos, a análise e a liberação de um quantitativo maior de lotes de vacina serão viabilizadas. Este ganho em produtividade condiz com a crescente priorização de métodos de controle de qualidade que gerem resultados precisos, em um curto intervalo de tempo.

Os parâmetros de adequação do sistema da nova metodologia ficaram em conformidade com o que é preconizado nos compêndios oficiais. O método demonstrou boa seletividade, bem como apresentou linearidade ao longo do intervalo de trabalho estudado. A média dos coeficientes de correlação esteve de acordo com o critério de aceitação estabelecido pela ANVISA (Brasil 2003) e pelo INMETRO (2010). A estatística t de Levene não foi significativa. A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson. A significância da regressão foi alta com desvio da linearidade não significativo.

O método apresentou uma precisão que pode ser considerada satisfatória, em termos dos coeficientes de variação obtidos, inferiores a 5%, conforme recomendado pelo guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA. Além disso, não foi evidenciada diferença significativa entre os resultados obtidos por analistas diferentes, em dias diferentes.

A recuperação média obtida demonstrou que o método otimizado apresenta exatidão adequada. Com relação à robustez, foi constatada a susceptibilidade do método a variações no pH da fase móvel e ao tempo de hidrólise.

A validação do método produziu dados adequados para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos obtidos e para o emprego da metodologia proposta no controle de qualidade do produto final, realizado pelo Laboratório Físico-Químico (LAFIQ), pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA), localizado no Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albani, SMF. **Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.** [Dissertação]. São Paulo: USP/Intituto Butantan/IPT. 2008. 95 p. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

Almeida, AECC. **Cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes.** [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. 2005. 167 p. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Alonso, IMT. **Controle Estatístico de Processo: O Caso da Produção da Vacina Contra *Haemophilus influenzae* Tipo b – Hib.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz – IOC. 2005. 102 p. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ayub MA, Pinto PRP. **Doença invasiva por *Haemophilus influenzae* B: perspectiva em vacinação.** Arq. méd. ABC. 1994 dez; 17(1/2):38-43.

Barbosa EF, Borges LL, Lúcio TC, Gil ES. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer. 2011. Goiânia, 7(12):1-20.

Bardotti A, Ravenscroft N, Ricci S, D'Ascenzi S, Guarnieri V, Averani G, et al. **Quantitative determination of saccharide in *Haemophilus influenzae* type b glycoconjugate vaccines, alone and in combination with DPT, by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.** Vaccine. 2000 abr 3; 18(19):1982-93.

Bio-Manguinhos. **Bio-Manguinhos/FIOCRUZ nacionaliza a vacina conjugada Hib e passa a produzir mais um imunobiológico 100% brasileiro.** Assessoria de Comunicação de Bio-Manguinhos. 2007. [on-line] [consultado em 22 jan. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/releases/2007-nacionalizacao-hib.pdf>.

..... **Histórico da parceria tecnológica entre Bio-Manguinhos e GSK.** Assessoria de Comunicação de Bio-Manguinhos. 2009. [on-line] [consultado em 22 jan. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/releases/2009-historico-bio-gsk-release-final.pdf>

..... [on-line] [consultado em 17 mar. 2012]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas>.

Bouskela MAL, Grisi S, Escobar AM de U. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b.** Revista Panamericana de Salud Pública. 2000 maio; 7(5):332-9.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** [on-line] [consultado em 24 out 2012]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm).

Brasil. Instrução de Trabalho (IT) número 0233 - LAFIQ / Bio-Manguinhos / Fiocruz. **Determinação do conteúdo de polissacarídeo por HPLC.** Aprovado em 16/05/2012.

Bricks LF. **Análise crítica sobre o uso das vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* do tipo b em diferentes países.** Pediatria (São Paulo). 1998 set; 20(3):216-29.

Brites LM. **Separação e Purificação do Ácido Clavulânico através de Extração Líquido - Líquido seguida de Adsorção em Coluna de Leito Fixo.** [Dissertação]. São Carlos: Centro de ciências exatas e de tecnologia da Universidade Federal de São Carlos. 2005. 86p. Programa de pós-graduação em Engenharia Química.

Cardoso MHWM, Gouvêa AV, Nóbrega AW da, Abrantes S de MP. **Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial.** Food Science and Technology (Campinas). maio de 2010; 30:63–72.

Carvalho CMN, Andrade ASS. **Vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo b: proteção a longo prazo.** Jornal de Pediatria. 2006. 82 (3):109-14.

Castro ESG. **Desenvolvimento de metodologia para determinação direta de sorbitol e glutamato em amostras pré-vacinais utilizando a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR)** [Dissertação]. Niterói: Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense. 2012. 132 p. Programa de Pós-Graduação em Química.

**Cromatografia iônica.** [on-line] [consultado em 17 mar. 2012]. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/23561589/A-cromatografia-de-troca-ionica>.

De la Guardia. **An integrated approach of analytical chemistry.** Journal of the Brazilian Chemical Society. 1999 dez; 10(6):429-37.

Dionex. **Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector.** Technical Note 21 LPN 034889-03 3.5M 10/98. Dionex Corporation, 1998.

Farmacopéia Européia. **Haemophilus type b conjugate vaccine.** Monograph 1219, 7 ed., vol.1, Council of Europe; Strasbourg, France, 2011.

Fitzwater SP, Watt JP, Levine OS, Santosham M. **Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines: Considerations for vaccination schedules and implications for developing countries.** Human Vaccines. 2010 out 1; 6:810-8.

Fritz JS, Gjerde DT. **Ion Chromatography.** 4<sup>a</sup> ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009.

Gadelha C, Azevedo N. **Vaccine innovations in Brazil: recent experiences and structural constraints.** História, Ciências, Saúde-Manguinhos. Janeiro de 2003;10:697-724.

Garner D, Weston V. **Effectiveness of vaccination for Haemophilus influenzae type b.** The Lancet. 2003 fev 1; 361(9355):395-6.

Goldblatt D. **Conjugate vaccines.** Clin Exp Immunol. 2000 jan. 119 (1):1-3. Medscape reference. **Haemophilus Influenzae Infections.** 18 de dezembro de 2012. [on-line] [consultado em 08 jan. 2013]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/218271-overview>.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos:** DOQ-CGCRE-008: Normatização e Qualidade Industrial: Revisão 4. Rio de Janeiro, 2011.

Kaplan, S. **Prevention of infections caused by Haemophilus influenzae.** Infectious Diseases Newsletter. 1988 jul; 7(7):51-3.

Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. **Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines.** Immunology. 2004 out 1;113(2):163-74.

Klein AC. **Cromatografia iônica como método analítico alternativo para a análise quantitativa de analitos.** [Monografia]. Porto Alegre: Instituto de Química da Universidade Federal do rio Grande do Sul. 2010. 46 p.

Lavizzari T, Teresa Veciana-Nogués M, Bover-Cid S, Mariné-Font A, Carmen Vida-Carou M. **Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A. 2006 set 29; 1129 (1):67-72.

Lorthiois APAA. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide tetânico.** [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2007. 152 p. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Intituto Butantan/IPT.

Marin JM, Silva MENB. **Ocorrência de *Haemophilus influenzae* em crianças atendidas em creches.** Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada. 2005; 26(3):167-74.

Martins, FO. **Avaliação da resposta imunológica humoral, em animais de experimentação, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada, desenvolvidas em Bio-Manguinhos.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 2011. 125 p. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos.

Metz B, Hendriksen CFM, Jiskoot W, Kersten GFA. **Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems.** Vaccine. 2002 jun 7; 20(19-20):2411-30.

Moxon ER. **Molecular basis of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease.** J. Infect. Dis. Junho de 1992; 165 Suppl 1:S77-81.

Nature. **Remembering things past.** Nature Immunology. 2011; 12(6):461-461.

Nunes, DK. **Fortalecimento das vantagens competitivas de Bio-Manguinhos no âmbito da inovação tecnológica de vacinas decorrentes da exposição à competição internacional.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. 2009. 94 p. Programa de Pós-Graduação Profissional em Saúde Pública.

Orlando RM. **Pré-Tratamento de Amostras.** Vita et Sanitas. 2009 jan-dez; 03:122-139.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. **Validation for chromatographic and electrophoretic methods**. Química Nova. Outubro de 2004; 27(5):771–80.

Rodrigues EO. **Elaboração de material de referência *in house* para vacina contra Hib e produtos intermediários. Uma proposta para normalização de testes físico-químicos do controle de qualidade**. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 2009. 106 p. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos.

Science photo library. ***Haemophilus influenzae* bacteria** [on-line] [consultado em 29 fev. 2012]. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/media/11205/enlarge>.

Silva RS. **Determinação de cianocomplexos metálicos em correntes de refinaria por cromatografia de íons com supressão de condutividade**. [Dissertação]. Niterói: Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense. 2005. 61 p. Programa de Pós-Graduação em Química.

Silva TM. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em Pescado**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2008. 103 p. Mestrado em Ciência de Alimentos.

Soto C, Cuello M, Alfonso Y, Cabrera O, Sierra G. **Validación de una técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos**. Vaccimonitor. 2002; (3):11-4.

Souza SVC, Junqueira RG. **A procedure to assess linearity by ordinary least squares method**. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos, 2005.

Talaga P et al. **Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates**. Vaccine. 2002 jun 7; 20 (19-20): 2474-84.

Tsai C-M et al. **Quantification of polysaccharide in *Haemophilus influenzae* type b conjugate and polysaccharide vaccines by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection**. Vaccine. 1994; 12(8): 700-6.

WHO | **Bacterial meningitis (including *Haemophilus influenzae* type b (Hib), *Neisseria Meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae*)** [on-line]. [consultado em 11 jan. 2013]. Disponível em: [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/diseases/meningitis\\_surveillance/en/index.htm](http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/meningitis_surveillance/en/index.htm)

## ANEXO

## Tabela da avaliação de linearidade de curva analítica

	Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA
---

**Dados da Curva Analítica**

Análise:	Determinação de PRP		
Data de Confeção da Curva:	03/01/2013	Curva N°:	Replicata independente
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Dionex ICS - 3000	Responsável:	Anelyse

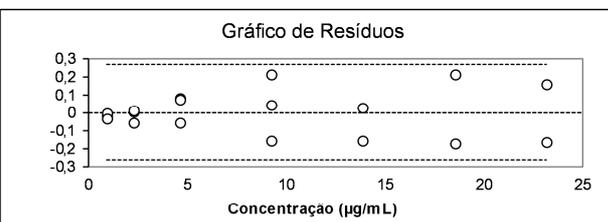
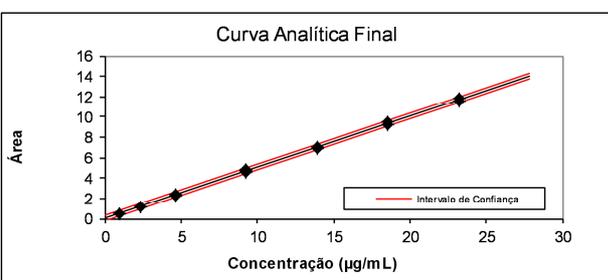
**Tabela de dados originais**

Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área
1	01	0,928	0,4657
	02	0,928	0,4860
	03	0,928	0,4533
2	04	2,320	1,1903
	05	2,320	1,2009
	06	2,320	1,1269
3	07	4,640	2,4277
	08	4,640	2,4227
	09	4,640	2,2945
4	10	9,280	4,8931
	11	9,280	4,7202
	12	9,280	4,5227
5	13	13,920	7,3130
	14	13,920	7,0348
	15	13,920	6,8482
6	16	18,560	9,8729
	17	18,560	9,5502
	18	18,560	9,1649
7	19	23,200	12,2494
	20	23,200	11,8244
	21	23,200	11,5033

**Avaliação de Valores Extremos**

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

**Normalidade dos Resíduos**

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,95

**Autocorrelação dos Resíduos**

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	3,08
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

**Estatísticas da Regressão Linear (Modelo:  $Y = a + bx$ )**

Coefficiente Angular (b):	5,02E-01	Coefficiente Linear (a):	2,13E-02
r	0,9995	R <sup>2</sup>	0,9991
N	18	Graus de Liberdade	16

**Homogeneidade da Variância dos Resíduos**

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,57E-02
t <sub>L</sub> calculado	-1,77E+00
t <sub>tabelado</sub> ( $\alpha = 0,05$ )	2,12E+00
p	9,64E-02

**Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)**

Limite de Detecção	5,56E-01	Limite de Quantificação	1,66E+00
--------------------	----------	-------------------------	----------

**ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)**

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,57E+02	2,57E+02	1,68E+04	1,30E-25
resíduos	16	2,44E-01	1,53E-02		
Ajuste	5	1,75E-02	3,50E-03	1,69E-01	9,69E-01
erro puro	11	2,27E-01	2,06E-02		
total	17	2,57E+02			

**Resumo da Avaliação**

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

**Observações**

--

Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA
---

Pág.:1/1
----------