

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Leonardo Santos Bastos

DETERMINAÇÃO DE 1-ETIL-3-(3DIMETILAMINOPROPIL)CARBODIIMIDA (EDAC), POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL, EM PSTT (Polissacarídeo conjugado com Proteína Tetânica) UTILIZADO NA FORMULAÇÃO DA VACINA CONTRA Hib PRODUZIDA EM BIOMANGUINHOS.

Rio de Janeiro

2015

Leonardo Santos Bastos

DETERMINAÇÃO DE 1-ETIL-3-(3DIMETILAMINOPROPIL)CARBODIIMIDA (EDAC), POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL, EM PSTT (Polissacarídeo de Hib conjugado com Proteína Tetânica) UTILIZADO NA FORMULAÇÃO DA VACINA CONTRA Hib PRODUZIDA EM BIOMANGUINHOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como o requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Kátia Christina Leandro
Co-orientador: André Luís Mazzei Albert

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Bastos, Leonardo Santos

Determinação de 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, em PSTT (polissacarídeo de hib conjugado com proteína tetânica) utilizado na formulação da vacina contra hib produzida em Biomanguinhos./ Leonardo Santos Bastos – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

86 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadores: Kátia Christina Leandro, André Luís Mazzei Albert

1. Haemophilus influenzae tipo b. 2. Vacinas Anti-Haemophilus. 3. Cromatografia Líquida. 4. Espectrometria de Massas 5. Controle de Qualidade. I. Título

Determination of 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC), by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, in PSTT (polysaccharide conjugated to tetanus protein) used in the formulation of Hib vaccine, manufactured at Bio-Manguinhos.

Leonardo Santos Bastos

DETERMINAÇÃO DE 1-ETIL-3-(3DIMETILAMINOPROPIL)CARBODIIMIDA (EDAC), POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL, EM PSTT (Polissacarídeo de Hib conjugado com Proteína Tetânica) UTILIZADO NA FORMULAÇÃO DA VACINA CONTRA Hib PRODUZIDA EM BIOMANGUINHOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como o requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em 10/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Bernardete Ferraz Spisso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Glauca Barbosa Candido Alves Slana (Doutor)
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Filipe Soares Quirino da Silva Filho (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Kátia Christina Leandro (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

André Luís Mazzei Albert (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A minha mãe Neide e a as minhas irmãs
Jacqueline e Janaina, pelo ensinamento
de vida, união e respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que ilumina a minha vida.

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

Aos meus orientadores, Prof(a). Dr(a). Kátia Christina Leandro e Prof. Dr. André Luís Mazzei Albert por sua dedicação, paciência e apoio ao longo da realização deste trabalho.

À minha família, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) por oferecer o Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

À Fiocruz e a Bio-Manguinhos por oferecerem toda a estrutura necessária à realização do trabalho.

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

Ao amigo Eduardo Castro, pela paciência e ajuda no manuseio do espectrômetro de massas.

Aos amigos Melissa Chamom, Luiz Claudio Pimentel, Lauro de Sena Laurentino, Camila Faia de Sá e Samara Graciane da Costa, por todo o apoio, incentivo, ajuda nos experimentos e por estarem sempre lá quando precisei.

A Dra Ivna Alana e ao Milton Neto do LATEB de Bio-Manguinhos pela ajuda e esclarecimento técnico.

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

O tempo é a distância entre
o sonho e a realidade

Antônio J. O. Bastos

RESUMO

A evolução das civilizações e a busca da melhoria da saúde caminham lado a lado. Das doenças que assolaram o Brasil e o mundo durante os séculos XIX e XX, as infecções bacterianas invasivas figuram entre as principais. O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), uma bactéria patogênica, se caracteriza como uma das bactérias mais importantes neste contexto, chegando a causar 30% dos casos de pneumonia e de 20 a 60% dos casos de meningite bacteriana nos países em desenvolvimento. A doença causada por Hib pode ser prevenida através da imunização da população com a vacina conjugada polissacarídeo-proteína. Bio-Manguinhos utiliza o método da carbodiimida, que se baseia no uso do 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) para realizar a conjugação do Poliribosil-Ribitol-Fosfato (PRP) de Hib com a Proteína Monomérica Tetânica (PMT) formando o conjugado Tetânico de Hib (PSTT). O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma nova metodologia para determinação do EDAC em PSTT, utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. Esse novo método permitiu a quantificação do EDAC no PSTT em nível de picograma (10^{-12} g), além de uma redução no tempo de análise e no fluxo de fase móvel em relação ao método anterior, que faz uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao detector de UV e que possui limite de detecção de 10^{-9} g/mL. A avaliação dos dados analíticos produziu resultados que garantem a confiabilidade do método permitindo que o mesmo seja posteriormente validado e empregado no controle de qualidade do produto intermediário PSTT realizado pelo Laboratório Físico-Químico, do Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos.

Palavras-Chave: EDAC, espectrometria de massas, Hib, Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (CLUE).

ABSTRACT

The evolution of civilizations and the pursuit of improved health walk side by side. Within the diseases that afflicted Brazil and the world during 19th and 20th centuries, the invasive bacterial infections are among the main ones. *Haemophilus Influenzae b* (*Hib*), a pathogenic bacteria, is characterized as one of the main causes of such infections, being responsible for up to 30% of pneumonia cases and 20-60% of bacterial meningitis cases in developing countries. The disease caused by *Hib* may be prevented by immunization of population with the polysaccharide-protein conjugated vaccine. Bio-Manguinhos employs the carbodiimide method, which is based on the use of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) to bind *Hib*'s polyribosylribitol phosphate (PRP) to tetanic monomeric protein (TMP), yielding the *Hib* tetanic conjugate (PSTT). This work presents the development of a new methodology to determine EDC in PSTT, using the technique ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. This new method allowed the quantitation of EDC in PSTT in pictogram (10^{-12} g) level, besides a reduction in assay time and in mobile phase flow when compared to the former method, which is based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to a UV detector, with a detection limit of 10^{-9} g/mL. The evaluation of analytical data generated results that guarantee method reliability, allowing it to be further validated and used in the quality control of the intermediate product PSTT by the Physicochemical Laboratory of Bio-Manguinhos the Quality Control Department.

Keywords: EDC, mass spectrometry, Hib, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do polissacarídeo capsular de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (LORTHIOIS, 2007).....	17
Figura 2 - Esquema da vacina contra a <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, composta de PRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico (ALMEIDA, 2005).	19
Figura 3 - Estrutura Química do EDAC	21
Figura 4 - EDAC no acoplamento entre um ácido e uma amina com baixa nucleofilicidade (GOYAL,2010)	22
Figura 5 - EDAC na desidratação de álcoois (GOYAL,2010)	22
Figura 6 - EDAC na oxidação selectiva de um álcool para uma cetona (GOYAL, 2010)	22
Figura 7 - Fluxograma simplificado de produção de Vacina contra Hib de Bio-Manguinhos.....	23
Figura 8 - Mecanismos de formação de íons por ESI (LANÇAS, 2009).....	27
Figura 9 - Esquema do ESI em modo positivo (LANÇAS, 2009).....	28
Figura 10 - Esquema Triplo Quadrupolo (PEREIRA <i>et al.</i> , 2005).....	28
Figura 11 - Esquema de análise em espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (BUSTILLOS, 2003).	29
Figura 12 - Amostra de PSTT (primeira injeção) analisada pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)	32
Figura 13 - Amostra de PSTT (segunda injeção) analisada pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)	33
Figura 14 - Padrão de EDAC 1,5 µg/mL analisado pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV).....	33
Figura 15 - Sobreposição das injeções da amostra de PSTT e do padrão de EDAC 1,5 µg/mL analisados pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)	34
Figura 16 - Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência da Waters acoplado ao espectrômetro de massas (Acquity Ultra Performance LC).	37

Figura 17 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 85% H ₃ CCOONH ₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 15% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30 ^o C / Fluxo: 0,3 mL/min.	49
Figura 18 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 60% H ₃ CCOONH ₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 40% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30 ^o C / Fluxo: 0,3 mL/min.	50
Figura 19 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 30% H ₃ CCOONH ₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 70% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30 ^o C / Fluxo: 0,3 mL/min.	51
Figura 20 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 20% H ₃ CCOONH ₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30 ^o C / Fluxo: 0,3 mL/min.	52
Figura 21 - Demonstração da varredura de íon Produto (<i>Productlon Scan</i>) (BUSTILLOS, 2003).	53
Figura 22 - Espectro de íon produto (<i>Productlon Scan</i>) do EDAC para o íon <i>m/z</i> 156	54
Figura 23 - Cromatograma de íons extraídos - Transição <i>m/z</i> 156>86 (intensidade 1.02E6).....	55
Figura 24 - Cromatograma de íons extraídos - Transição <i>m/z</i> 156>58 (intensidade 6.76E5).....	56
Figura 25 - Gráfico da estabilidade do EDAC em meio aquoso a 25 ^o C.	58
Figura 26 - Demonstração da intensidade do sinal do EDAC em meio aquoso.....	59
Figura 27 - Gráfico da estabilidade do EDAC em fase móvel a 25 ^o C.	60
Figura 28 - Demonstração da intensidade do sinal do EDAC em fase móvel.	60
Figura 29 - Cromatograma de uma amostra de PSTT	61
Figura 30 - Solução contendo PMT e PRRP (Branco)	62
Figura 31 - Comparação entre solução branco e solução branco contaminada com EDAC	63
Figura 32 - Curva de adição padrão para avaliar a interferência de matriz.....	64
Figura 33 - Espectro de massas da solução padrão de EDAC a 4µg/mL	66
Figura 34 - Espectro de massas da solução branco (PMT + PRRP).....	67

Figura 35 - Espectro de massas da solução branco contaminada com EDAC a 2µg/mL	68
Figura 36 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva A	69
Figura 37 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva B	70
Figura 38 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva C	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho. ...	36
Tabela 2 - Tabela descrevendo a preparação da curva de padrão e de adição padrão de EDAC para avaliação da seletividade.	42
Tabela 3 - Preparo dos pontos da curva de calibração para a avaliação da linearidade do método.	43
Tabela 4 - Curva de adição padrão de EDAC para o ensaio de recuperação.....	47
Tabela 5 - Teste-t entre os grupos de coeficientes angulares das curvas de adição padrão e curva de calibração para avaliar a interferência da matriz	65
Tabela 6 - Resultado do ensaio de recuperação realizado na amostra de PSTT	72
Tabela 7 - Teste F para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 25°C.....	74
Tabela 8 - Teste t para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 25°C.....	74
Tabela 9 - Teste F para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 35°C.....	75
Tabela 10 - Teste t para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 35°C.....	75
Tabela 11 - Teste F para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 9,5.....	76
Tabela 12 - Teste t para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 9,5.	76
Tabela 13 - Teste F para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 10,5.....	77
Tabela 14 - Teste t para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 10,5.	77
Tabela 15 - Tabela da avaliação de linearidade de curva de calibração (SOUZA E JUNQUEIRA, 2005 com adaptações)	83

LISTA DE SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Atmospheric Pressure Ionization – Ionização à pressão atmosférica
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência
CLUE (UPLC)	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (<i>Ultra-high Pressure Liquid Chromatography</i>)
CLUE-EM/EM	Cromatografo a Líquido de Ultra Eficiência acoplado a espectrômetro de massas sequencial
CTV	Complexo Tecnológico de Vacinas
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DIC	Dissociação Induzida por Colisão
DPa	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y
EDAC	1-Etil-3-(3dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI	Eletrospray
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H ₃ CCOONH ₄	Acetato de Amônio
Hib	Haemophilus influenzae do tipo b
IC	Inclinação da curva de calibração
IgG	Imunoglobulina G
LAFIQ	Laboratório Físico-Químico

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa/carga
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
PMT	Proteína Monomérica Tetânica
PRP (ou PRRP)	poliribosil-ribitol-fosfato
PSTT	Conjugado Tetânico de Hib
r	Coefficiente de correlação
R ²	Coefficiente de determinação
TIC	Cromatogramas de Íons Totais
TT	Toxóide tetânico
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A DOENÇA DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE SOROTIPO B (HIB)	16
1.2. A VACINA CONTRA HAEMOPHILUS INFLUENZAE DO TIPO B (HIB)	18
1.2.1 VACINAS DE POLISSACARÍDEOS	18
1.2.2 VACINAS CONJUGADAS DE POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA	19
1.2.3 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO	20
1.3. CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	23
1.3.1. CROMATOGRAFIA - CLUE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA)	23
1.3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	25
1.4. CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS NO BRASIL: O RENASCIMENTO, ADEQUAÇÃO AOS PADRÕES INTERNACIONAIS E AS TENDÊNCIAS MODERNAS.	30
2. OBJETIVO	35
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVO ESPECIFICO	35
3. MATERIAS E MÉTODOS	36
3.1. MATERIAL	36
3.1.1. REAGENTES E SOLVENTES	36
3.1.2. AMOSTRAS	36
3.1.3. EQUIPAMENTO	37
3.2. OTIMIZAÇÃO DO METODO	38
3.2.1. OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL	38
3.2.2. OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA	38
3.2.3. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	38
3.2.4. TESTE MISCIBILIDADE	39
3.2.5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EDAC	39
3.3. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	39
3.3.1. SELETIVIDADE	40
3.3.2. LINEARIDADE	42
3.3.3. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	43
3.3.4. EXATIDÃO	46
3.3.5. ROBUSTEZ	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1. OTIMIZAÇÃO DO METODO	48
4.1.1. OTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL	48

4.1.2. OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA	53
4.1.3. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	53
4.1.4. TESTE MISCIBILIDADE	56
4.1.5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO EDAC	57
4.2. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.....	61
4.2.1. SELETIVIDADE.....	61
4.2.2. LINEARIDADE.....	69
4.2.3. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	71
4.2.4. EXATIDÃO.....	72
4.2.5. ROBUSTEZ	73
5. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS	80
ANEXO.....	83

1. INTRODUÇÃO

A evolução das civilizações e a busca da melhoria da saúde caminham lado a lado. Ações de controle do exercício da medicina, o meio ambiente, os medicamentos e os alimentos existiram desde longínquas eras. Povos antigos, como os babilônios e os hindus, estabeleceram preceitos morais e religiosos – fixados nos códigos de Hamurabi e de Ur-Namu, respectivamente – e regras sobre a conduta dos profissionais que tratavam as doenças. A saúde era considerada essencial à dignidade humana. Achados arqueológicos demonstram que no século XVI a.C. o homem já possuía habilidade para preparar drogas, e lhes delimitar prazos de validade. Os alimentos também faziam parte das preocupações de povos antigos, e até mesmo os perfumes que poderiam ser objetos de práticas desonestas por parte dos comerciantes. Na Índia, em 300 a.C., uma lei proibiu a adulteração de alimentos, medicamentos e perfumes. Desde a Antiguidade Clássica até a Idade Média se desenvolveram ações de saneamento do meio ambiente (controle da água e do esgoto, limpeza das ruas e dos mercados); normatização da prática profissional dos médicos, dos cirurgiões e dos farmacêuticos; determinação de observância de cuidados para com os medicamentos, as boticas, os alimentos. A partir das medidas estabelecidas em Veneza, em 1348, teve início a vigilância dos portos para impedir a entrada de epidemias nas cidades. Visando barrar a entrada da peste se estabeleceu a inspeção das embarcações, passageiros e das suas cargas, especialmente quando infectadas ou suspeitas (ROSEN, 1998).

Das doenças que assolaram o Brasil e o mundo durante os séculos XIX e XX, as infecções bacterianas invasivas figuram entre as principais, sendo uma das grandes causas de mortalidade e morbidade na infância no mundo todo. O *Haemophilus influenzae* (Hi) se caracteriza como uma das bactérias mais importantes neste contexto, chegando a causar 30% dos casos de pneumonia e de 20 a 60% dos casos de meningite bacteriana nos países em desenvolvimento (BOUSKELA, 2000).

1.1. A DOENÇA DE *Haemophilus influenzae* SOROTIPO b (Hib)

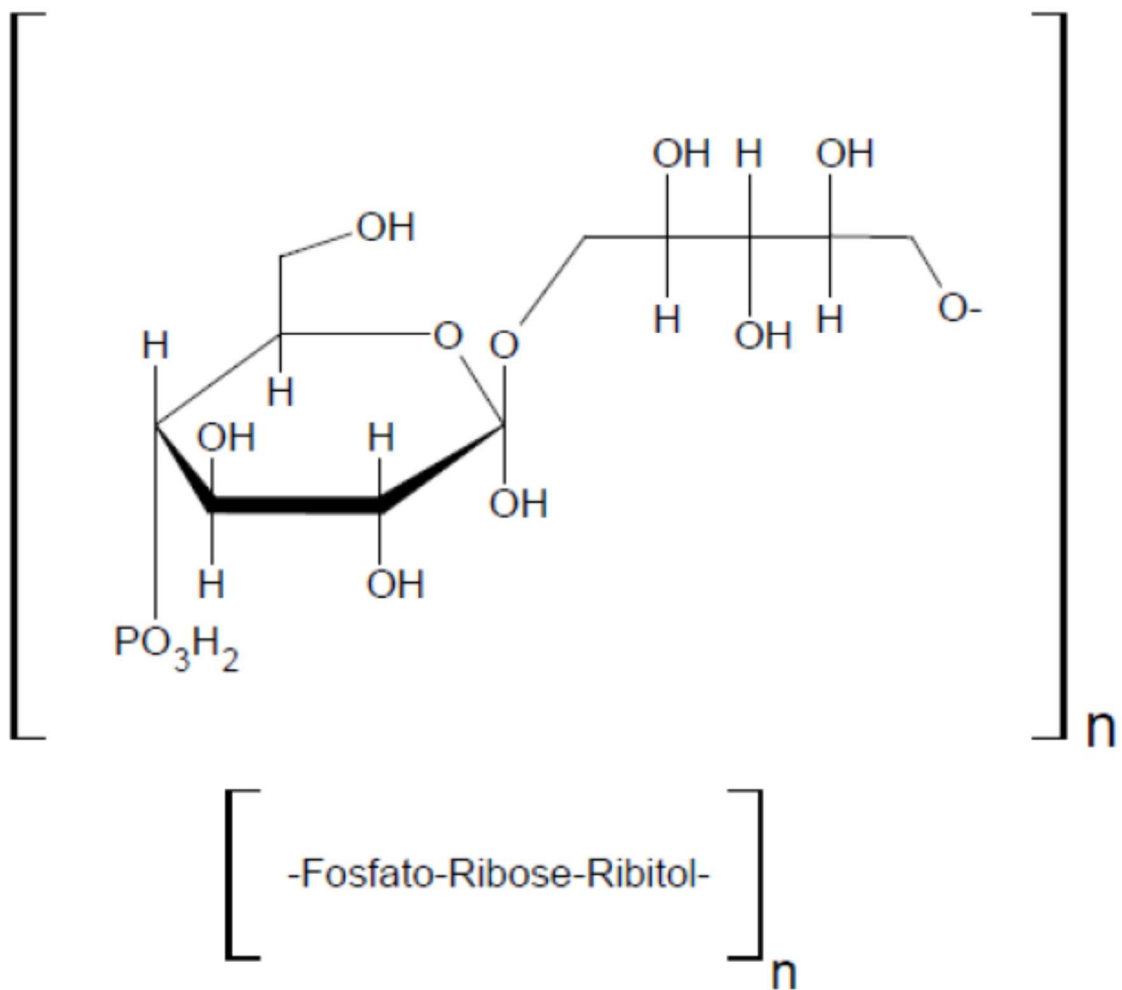
A *H. influenzae* é uma bactéria cocobacilar Gram negativo, aeróbia facultativa da família Pasteurellaceae, sendo estimada como a maior causadora de infecção bacteriana em crianças menores de 5 anos e idosos levando ao quadro clínico diagnosticado como otite média aguda, bacteremia, meningite, pneumonia e artrite séptica (PELTOLA, 2000).

A *H. influenzae* foi descrita pela primeira vez em 1892 por Richard Pfeiffer durante uma pandemia de influenza e sendo inicialmente designada de bacilo de Pfeiffer. Foi confundida como a causa da gripe comum, atualmente definida como causada pelo vírus influenza, até 1933 (KUHNERT, 2008).

Pittman (1931) demonstrou a possibilidade de isolamento das formas encapsuladas e não encapsuladas da *H. influenzae*, e dentro das linhagens da forma encapsulada conseguiu identificar seis sorotipos antígenicamente distintos (**a-f**). Em suas pesquisas ainda conseguiu observar que toda linhagem isolada de sangue ou fluido cérebro espinhal de pacientes jovens com meningite pertencia ao sorotipo tipo **b** e que nas secreções do trato respiratório superior de adultos eram encontradas as linhagens não encapsuladas.

A cápsula da bactéria é constituída de polissacarídeo de alta massa molecular e, a estrutura desse, define seu sorotipo que pode ser de **a** a **f**, sendo o sorotipo **b** o único de interesse médico (WENGER *et al.*, 1990). A cápsula do tipo **b** é composta de unidades repetitivas de poliribosil-ribitol-fosfato (PRP) (figura 1) sendo considerado o maior fator de virulência do microorganismo (KNISKERN e MARBURG, 1994).

Figura 1 - Estrutura química do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (LORTHIOIS, 2007)



Fothergill e Wright (1933) demonstraram a ausência de anticorpos bactericidas no sangue de crianças com pouca idade quando comparados ao de crianças mais velhas ou adultos, sendo descrita assim a primeira evidência da relação entre idade do paciente e a doença causada por *H. influenzae* do tipo **b** (Hib).

A Hib não causa um quadro clínico único e específico, diferente de outras doenças como sarampo, catapora ou poliomielite, que permite diagnóstico rápido e preciso, necessitando coleta de sangue e/ou fluido cérebro espinhal para isolamento e identificação em laboratório, para a confirmação da presença deste agente infeccioso no organismo humano. Em muitos dos casos por se tratar de uma doença silenciosa, o início do tratamento acaba sendo retardado (WATT *et al.*, 2003).

Das doenças invasivas causadas pela Hib, a meningite é o principal marcador epidemiológico devido à grande dificuldade de isolamento do agente nos outros tipos de infecção (BOUSKELA, 2000).

1.2. A VACINA CONTRA *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* DO TIPO B (HIB)

1.2.1 Vacinas de polissacarídeos

O antígeno de maior eficiência para a formulação de vacinas de polissacarídeos contra bactérias encapsuladas, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* é o principal fator de virulência e neste caso o próprio polissacarídeo componente da cápsula bacteriana (LORTHIOIS, 2007).

Existem relatos que na década de 40 surgiram as primeiras tentativas para utilizar o polissacarídeo capsular como imunógeno, entretanto, com as doenças infecciosas na época sendo bem controladas com o uso de antibióticos, o desenvolvimento da vacina foi adiado para décadas depois, aproximadamente na década de 60, quando foram relatados os primeiros casos de indivíduos resistentes a antibióticos (COCHI *et al.*, 1985).

As vacinas de polissacarídeos, além de não produzirem anticorpos capazes de proteger contra Hib crianças com menos de 24 meses, considerado grupo de alto risco, pois o sistema imunológico se encontra em processo de maturação, mesmo com seu reforço não conduzem a um aumento nos níveis de anticorpos (JONES, 2005).

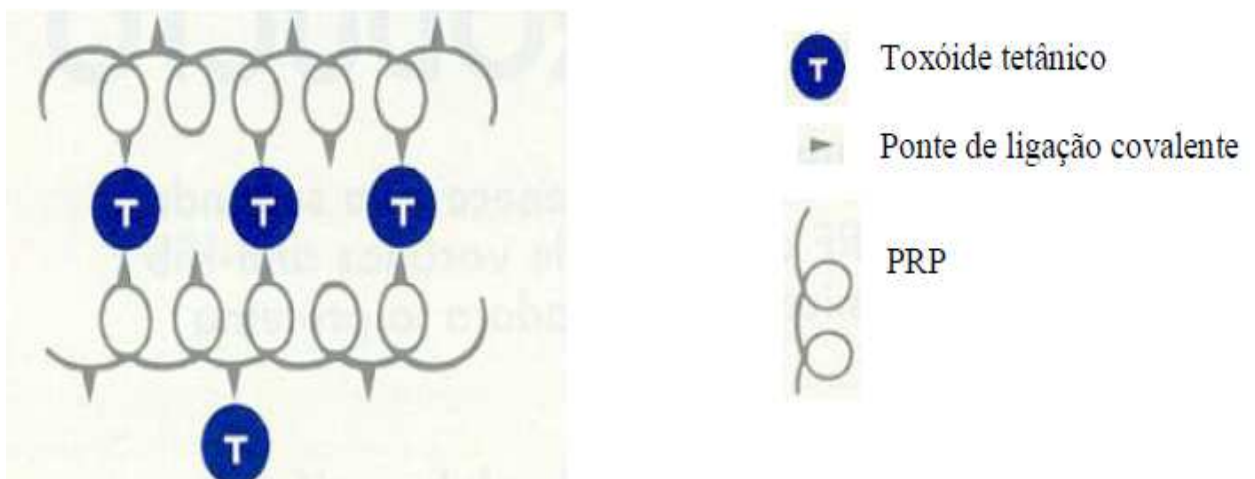
As limitações imunológicas das vacinas polissacarídicas podem ser revertidas conjugando as mesmas com proteínas carreadoras.

1.2.2 Vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína

As primeiras vacinas conjugadas contra a *Haemophilus influenzae* tipo b foram licenciadas no final da década de 80 (FITZWATER *et al.*, 2010). Esse modelo de vacina produz a indução de memória imunológica, realizando proteção de longa duração, com anticorpos IgG de alta afinidade, e é eficaz para todas as faixas etárias, incluindo as crianças menores de 2 anos de idade, consideradas grupos de risco (JONES, 2005).

As vacinas licenciadas para uso contra a Hib são baseadas na conjugação com o toxóide diftérico, o toxóide tetânico ou com uma proteína externa de membrana meningocócica (figura 2). Deste modo, as vacinas conjugadas contra Hib apresentam variações quanto ao tipo de proteína carreadora, ao método de conjugação utilizado e ao tamanho da cadeia do polissacarídeo, fornecendo diferentes propriedades imunológicas (GOLDBLATT, 2000).

Figura 2 - Esquema da vacina contra a *Haemophilus influenzae* tipo b, composta de PRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico (ALMEIDA, 2005).



1.2.3 Métodos de conjugação

Na literatura são descritas várias técnicas de conjugação aplicadas no desenvolvimento de vacinas, entre elas são consideradas clássicas o método do brometo de cianogênio, o método da aminação redutiva e o método da carbodiimida que incluem a inserção de uma molécula espaçadora entre o polissacarídeo e a proteína (LORTHIOIS, 2007).

O método do brometo de cianogênio ativa as hidroxilas do polissacarídeo disponibilizando-as para reagir com grupamentos amino (disponibilizados pelas proteínas) e/ou com os espaçadores moleculares. Tem como grande desvantagem a alta toxicidade do brometo de cianogênio, causando gastos adicionais com equipamentos de segurança, aumentando o custo final da vacina. O método da aminação redutiva prevê a ligação dos radicais aldeído aos grupos amino da proteína, tendo como desvantagem a demora, sendo necessário o uso de agentes bactericidas para evitar o crescimento de bactérias que possam contaminar a solução (LORTHIOIS, 2007).

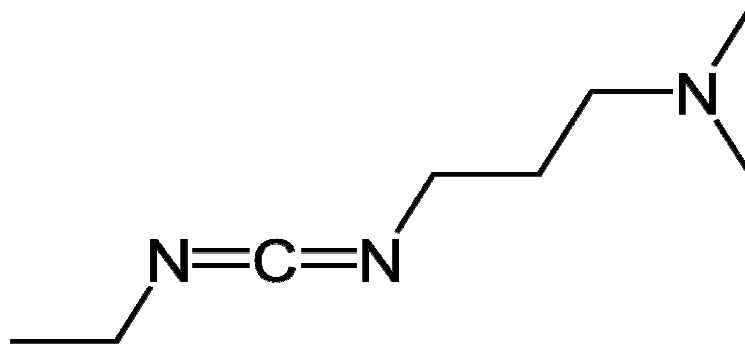
No método da carbodiimida são ativados os diversos grupos carboxílicos pertencentes ao polissacarídeo utilizando a carbodiimida. A partir daí duas vias podem ocorrer: o polissacarídeo pode ser derivatizado com uma molécula espaçadora e depois acoplado à proteína que previamente deve estar ativada com carbodiimida; ou a proteína pode ser derivatizada e em seguida acoplada ao polissacarídeo ativado com 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil)carbodiimida(EDAC). (LORTHIOIS, 2007)

Em Bio-Manguinhos o EDAC (figura 3) é utilizado na conjugação do Poliribosil-Ribitol-Fosfato (PRP) com a Proteína Monomérica Tetânica (PMT) para a formação do Conjugado Tetânico de Hib (PSTT) que é o segundo intermediário do processo produtivo da fabricação da vacina contra a Hib.

O mecanismo para a formação do conjugado tetânico de Hib proposto por Bio-Manguinhos consiste primeiramente em realizar uma redução nas hidroxilas do polissacarídeo, utilizando brometo de cianogênio, introduzindo um grupamento amino; em outra fase o EDAC ativa a proteína atacando o grupamento de ácido carboxílico

da mesma formando um éster, que é um bom grupo de saída. O grupamento amino do polissacarídeo ataca o éster formado na proteína e assim é gerado o Conjugado Tetânico de Hib (PSTT) de Bio-Manguinhos.

Figura 3 - Estrutura Química do EDAC



O EDAC é um sólido cristalino branco com massa molar 155,25 g/mol e ponto de fusão de 110-115°C, é um reagente orgânico versátil para muitas reações, conhecido como agente de desidratação eficaz vulgarmente utilizada na síntese de amidas, ésteres e anidridos. Solúvel em água se degrada na mesma e em temperatura elevadas, com grande velocidade, tendo como subproduto de degradação uma uréia. Por esse motivo, recomenda-se ser acondicionado a -20°C. O EDAC é considerado um produto químico muito importante em sua própria classe, superior a outros reagentes de acoplamento tradicionais (GOYAL, 2010).

Segundo Goyal (2010), o EDAC tem grande utilidade no acoplamento entre um ácido e uma amina com baixa nucleofilicidade (figura 4) aumentando o rendimento para até 83% do produto, na desidratação de álcoois (figura 5) e na oxidação seletiva de um álcool para uma cetona (figura 6).

Figura 4 - EDAC no acoplamento entre um ácido e uma amina com baixa nucleofilicidade (GOYAL,2010)

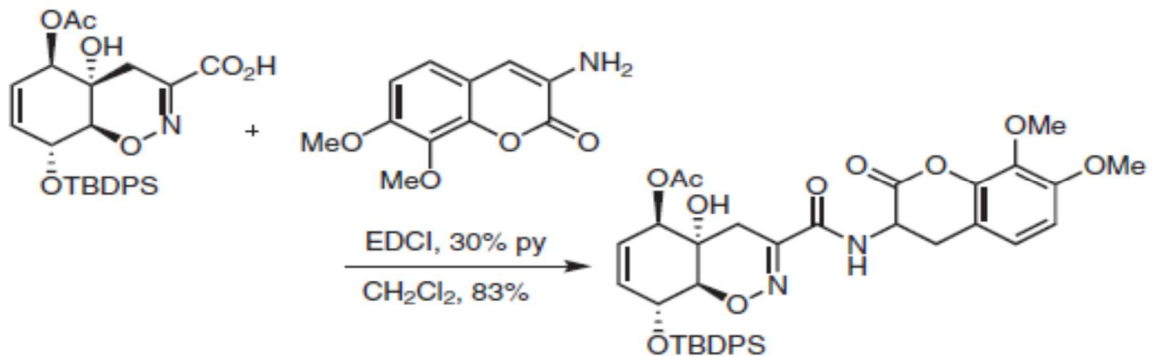


Figura 5 - EDAC na desidratação de álcoois (GOYAL,2010)

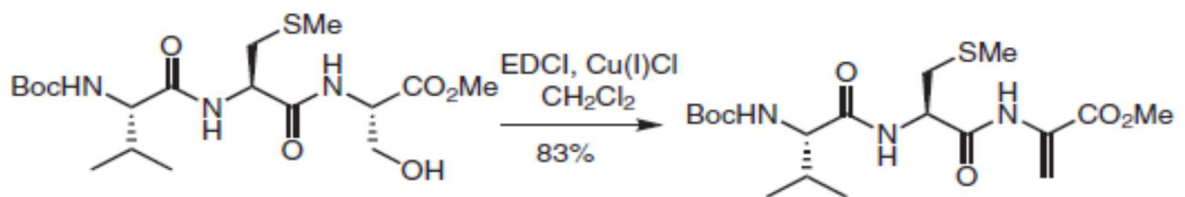
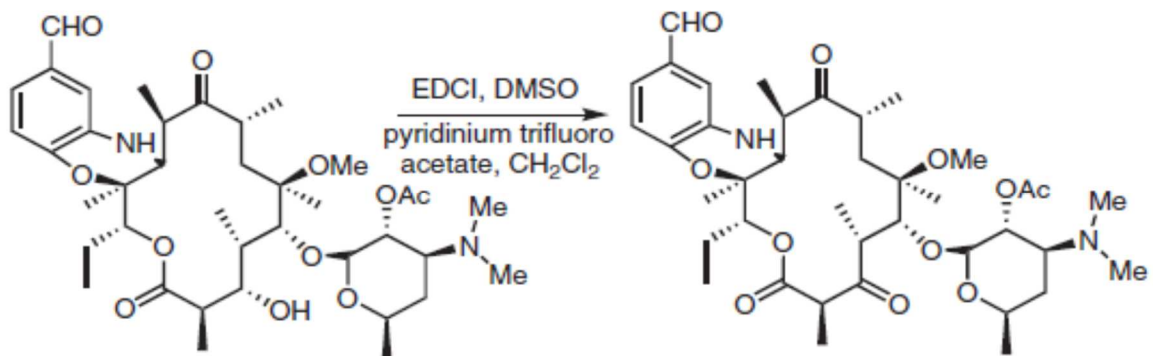
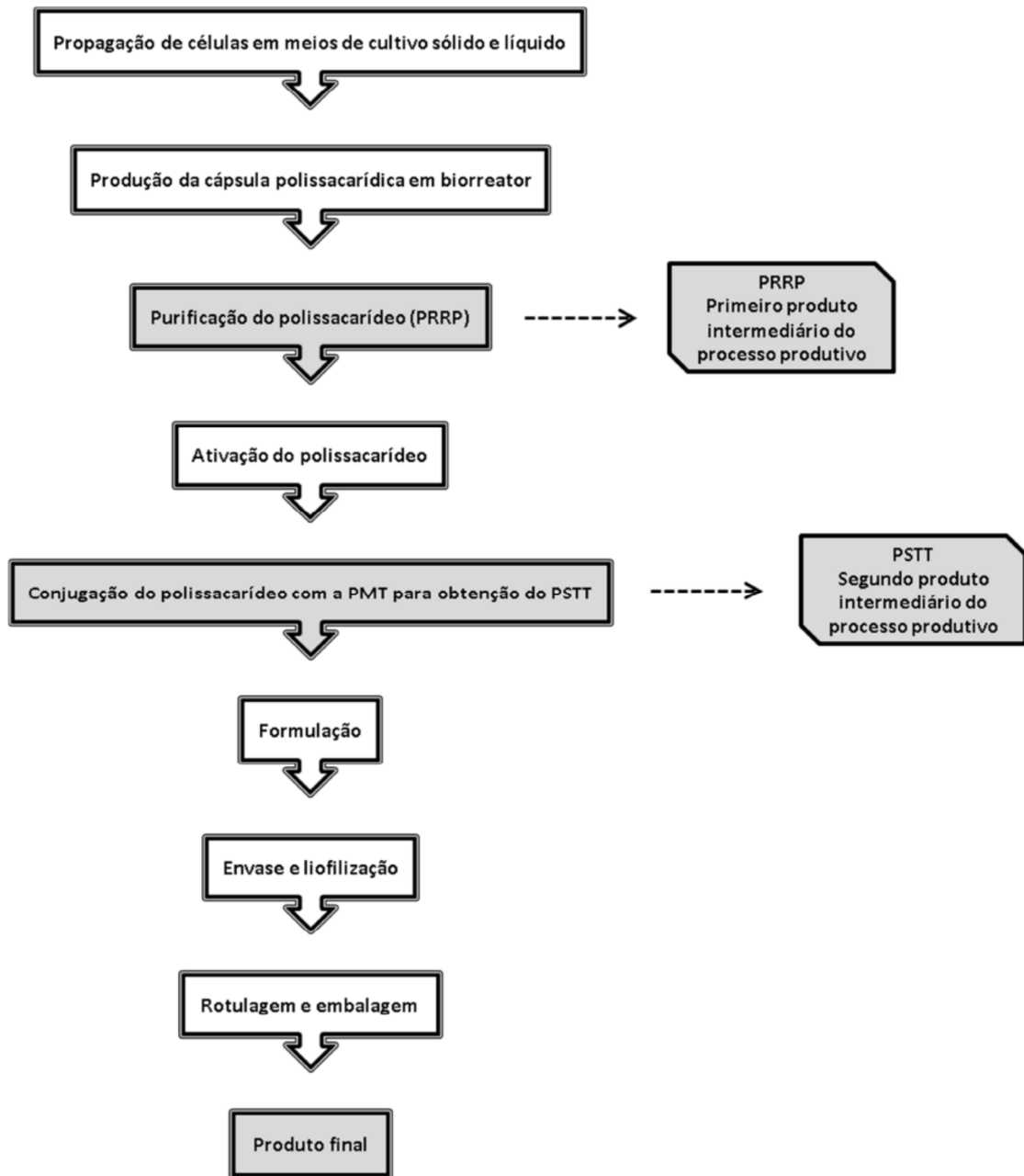


Figura 6 - EDAC na oxidação selectiva de um álcool para uma cetona (GOYAL, 2010)



A figura 7 apresenta um fluxograma simplificado da produção da vacina contra Hib produzida em Bio-Manguinhos.

Figura 7 - Fluxograma simplificado de produção de Vacina contra Hib de Bio-Manguinhos



1.3. CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

1.3.1. Cromatografia - CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

Com a expansão da utilização da técnica de cromatografia pela indústria farmacêutica e também por outras indústrias na última década, o desenvolvimento da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) tem sido direcionado à obtenção de

análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. A alternativa para atingir esse objetivo foi a redução concomitante do tamanho das partículas da fase estacionária e da coluna, porém, por causa da elevada pressão resultante desta redução, que não é compatível com os sistemas cromatográficos convencionais, ficou limitada por um período. O uso de partículas menores que 2 µm se tornou possível recentemente, com o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) também conhecida como UPLC (*Ultra-high Pressure Liquid Chromatography*) (MALDANER, 2009).

A CLUE é uma tecnologia ainda recente, que se baseia nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mas que combina a utilização de colunas empacotadas com partículas de diâmetro inferior a 2µm, altas velocidades lineares da fase móvel e instrumentação que permite operar com altas pressões da mesma (6.000 – 15.000psi), o que possibilita como resultado o aumento da eficiência, a melhora da resolução, a melhoria da detectabilidade e a diminuição significativa do tempo de análise em comparação com a CLAE convencional

(QUEIROZ, FERRACINE, & ROSA, 2012).

As principais modificações de um sistema CLAE para um sistema CLUE são: capacidade de trabalhar a pressões mais elevadas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão em volumes pequenos de até 1 µL (MALDANER, 2009).

A cromatografia pode ser combinada a vários sistemas de detecção, pois se trata de uma técnica muito utilizada e de excelente desempenho. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas soma as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência na separação, com as do espectrômetro de massas, informações estruturais, massa molar e adicional seletividade. A combinação de CLUE-EM/EM fornece vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise (OLIVEIRA, 2010).

1.3.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem despontado como técnica chave na indústria farmacêutica, atuando desde a pesquisa para a descoberta de novos fármacos, como também no controle de qualidade, e é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, propriedades químicas da molécula e quantificação de compostos conhecidos (OLIVEIRA, 2010).

Os espectrômetros de massas são comumente conhecidos através da técnica de introdução da amostra (ex. Cromatografia líquida – CL e cromatografia gasosa – CG), através da técnica de ionização (ex. API – *Atmospheric Pressure Ionization*) e através do tipo de analisador de massas e/ou combinação dos mesmos em um único sistema (ex. Quadrupolo, Tripoquadrupolo). Assim, a técnica de CLUE-EM/EM compreende a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detector de massas sequencial (dois filtros de massas).

O acoplamento do detector de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) à técnica de cromatografia líquida, como a CLUE, transforma o CLUE-EM/EM em uma ferramenta valiosa para a química analítica, permitindo que compostos pré-separados sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade, sensibilidade, confiabilidade e mais agilidade, permitindo ainda que amostras com matrizes complexas (fluidos biológicos, vacinas e alimentos) sejam analisados livres de interferentes ou com métodos de purificação de amostras mais simples (CHIARADIA *et al.*, 2008).

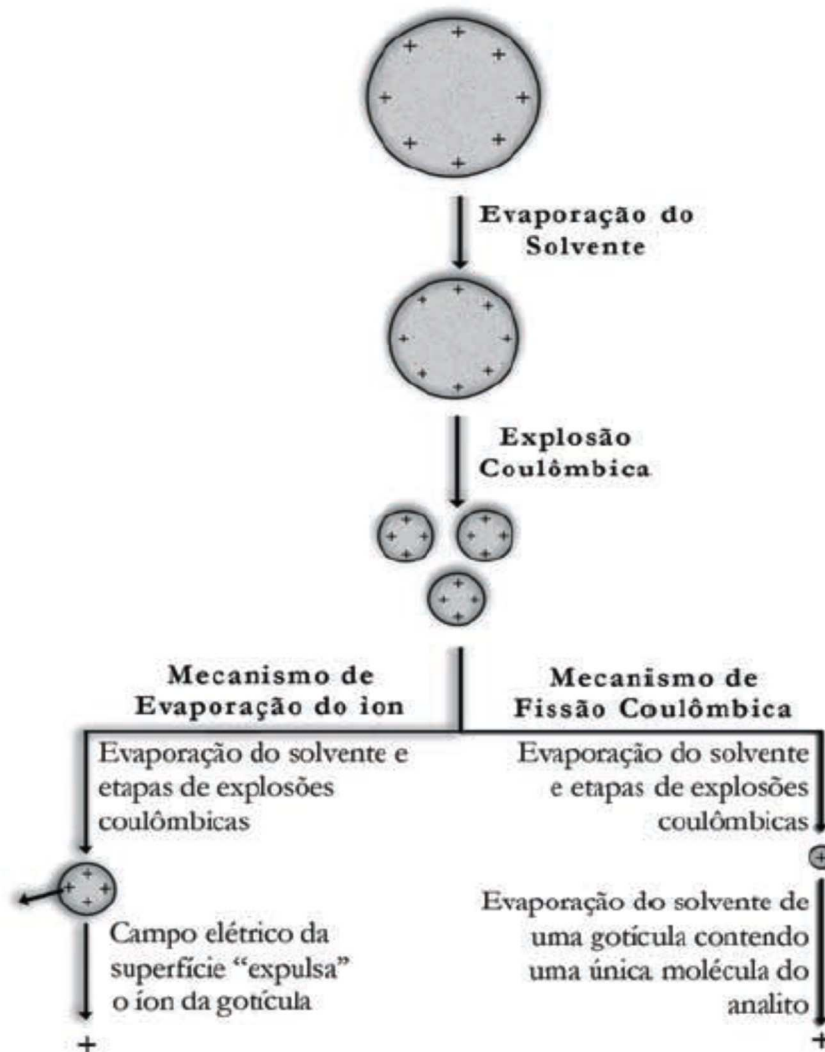
O modo de ionização por eletrospray (*Electrospray, ESI*) é uma das formas de ionização da amostra, utilizadas na espectrometria de massas, que permite a formação de íons na pressão atmosférica ao invés de vácuo, se trata de uma ionização branda e normalmente é acoplada à cromatografia líquida (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O ESI gera íons através de um aerossol de solução formado depois da mesma ser pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem entre 3.000 e 5.000 V. Uma vez formado esse spray as gotas são, rapidamente, desolvatadas por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) e os

íons são carregados diretamente para a fase gasosa, fluindo para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (CHIARADIA *et al.*, 2008).

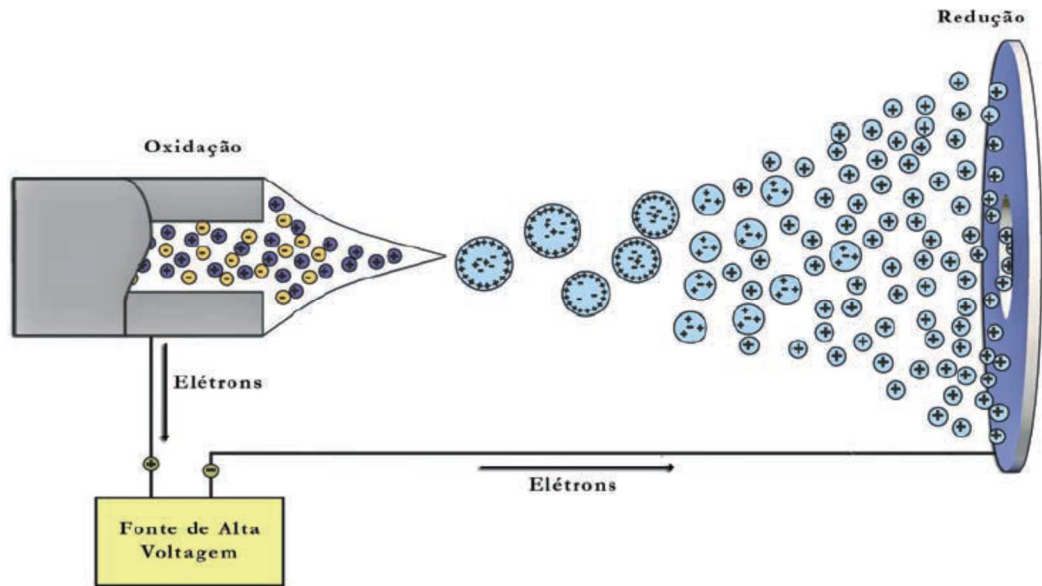
Segundo Lanças (2009), ocorrem dois mecanismos (Figura 8) que explicam o processo de ionização da amostra por ESI. Primeiro o mecanismo do resíduo de carga ou da fissão proposto por Dole em 1968, que propõe, que à medida que as gotículas evaporam, sua carga permanece inalterada e as gotículas “explodem” em inúmeras gotículas menores, chamado de explosão coulômbica. Contínuas explosões acontecem até que apenas um íon do analito permaneça, chegando a um íon em fase gasosa após a evaporação da última gotícula do solvente. Em segundo temos o mecanismo da evaporação do íon proposto por Iribarne e Tomson, em 1976, onde também se propõe que pequenas gotículas são formadas na explosão coulômbica, sendo que neste mecanismo a força do campo elétrico na superfície destas gotículas é suficientemente elevada para removê-las da superfície, transferindo diretamente para a fase gasosa, que é energeticamente mais favorável para íons solvatados. Os dois mecanismos podem operar simultaneamente dependendo da faixa de massa do analito.

Figura 8 - Mecanismos de formação de íons por ESI (LANÇAS, 2009)



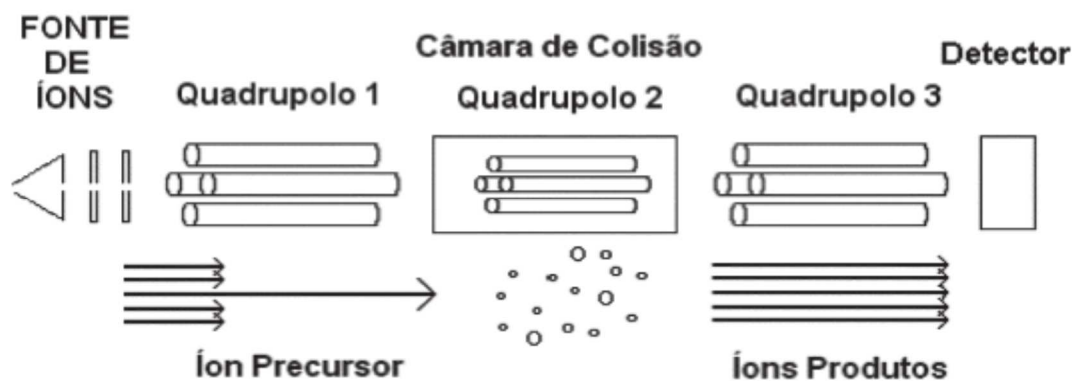
No modo de ionização ESI, o efluente que vem da cromatógrafo (CLAE/CLUE) é introduzido na sonda com carga balanceada e quando sai, carrega uma carga iônica líquida. Para garantir que a ESI seja um processo contínuo, a solução precisa compensar a carga por processos eletroquímicos nos quais uma superfície condutiva age como eletrodo. O eletrospray pode ser operado no modo positivo ou negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas que saem do spray terão carga positiva e o eletrodo receberá os elétrons (figura 9). De forma contrária, no modo negativo ocorrerá o oposto (LANÇAS, 2009).

Figura 9 - Esquema do ESI em modo positivo (LANÇAS, 2009)



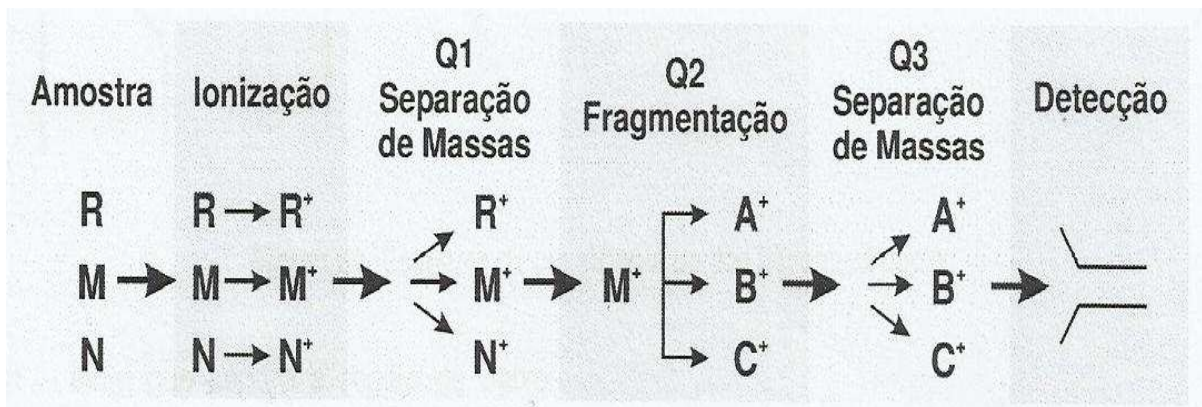
O CLUE-EM/EM é um sistema no qual há dois estágios de massas. Nesse sistema é utilizado um triplo quadrupolo como analisador de massas, caracterizado por três quadrupolos em série (figura 10), onde o primeiro quadrupolo é o filtro de massas responsável pela seleção do íon de interesse (geralmente a molécula protonada $[M+H]^+$). A molécula protonada (íon precursor) é fragmentada no segundo quadrupolo, também denominado célula (ou câmara) de colisão, por um processo de Dissociação Induzida por Colisão (DIC), utilizando um gás inerte como gás de colisão. Os íons gerados na fragmentação do íon precursor são denominados íons produtos e separados pela sua relação massa/carga (m/z) no terceiro quadrupolo e direcionados ao sistema de detecção (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Figura 10 - Esquema Triplo Quadrupolo (PEREIRA *et al.*, 2005)



A figura 11 exemplifica um esquema de análise em espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, onde a mistura com compostos “R”, “M” e “N” após processo de ionização formam espécies “R⁺”, “M⁺” e “N⁺”. No Filtro Q₁ de massa, apenas “M⁺” é selecionado para o filtro Q₂, onde ocorre o processo de fragmentação formando as espécies “A⁺”, “B⁺” e “C⁺”. Os íons são encaminhados ao filtro Q₃ onde só o fragmento “B⁺” é selecionado para o detector.

Figura 11 - Esquema de análise em espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (BUSTILLOS, 2003).



As principais vantagens do CLUE-EM/EM em relação a CLAE-UV são: Sensibilidade, seletividade e velocidade na análise.

A sensibilidade se deve à presença de dois estágios de massas. O primeiro estágio de separação filtra o ruído químico, pois selecionando apenas um íon pode-se aumentar o sinal da substância de interesse, suprimindo a geração de outros componentes da amostra (ruído). A seletividade está relacionada com a capacidade de monitoramento seletivo que permite selecionar e monitorar transições específicas de cada analito, identificando assim, de forma mais seletiva, a substância de interesse.

1.4. CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS NO BRASIL: O RENASCIMENTO, ADEQUAÇÃO AOS PADRÕES INTERNACIONAIS E AS TENDÊNCIAS MODERNAS.

O controle de qualidade de vacinas no Brasil teve um grande marco histórico no ano de 1981, quando o país se via às vésperas de uma campanha nacional de imunização contra a poliomielite e foram observadas alterações de cor, assim como a presença de impurezas macroscópicas nos frascos das vacinas. Tal observação motivou uma análise mais rigorosa acerca da natureza da contaminação por parte da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O resultado da análise tornava evidente a existência de falhas ao longo do processo produtivo no Laboratório Torlak (PONTE, 2003).

Tornava-se latente a necessidade da criação por parte da esfera pública de mecanismos de controle e garantia da qualidade desses produtos, consoante ao contexto social em que o Brasil se encontrava naquele momento.

A partir deste momento, a promoção da saúde pública brasileira ganha um novo significado para as autoridades sanitárias, muito bem sintetizado por Gil, 2010:

Qualidade para os medicamentos é um atributo de caráter não apenas comercial, mas, também, legal, ético e moral. Assim, enquanto qualidade para muitos produtos é uma questão de competitividade, no campo da saúde deve ser obrigatoriamente atendida.

No que tange à qualidade das vacinas, a atuação das Agências Regulatórias, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é imperativa. Suas recomendações visam garantir o mínimo, porém, alto padrão de qualidade dos produtos, internacionalmente estabelecidos. Desde as matérias-primas, passando por seus produtos intermediários até a obtenção do produto final devem atender aos níveis de qualidade pré-determinados. O produto final deve ser investigado quanto a sua identidade, esterilidade, estabilidade, segurança e potência por metodologias validadas, tanto pelo Órgão Produtor quanto pelo Laboratório Nacional onde o produto será disponibilizado.

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 presentes. Muitas vezes é preciso conhecer a proporção entre determinados constituintes e a maneira como estes constituintes estão interagindo (ALMEIDA, 2005; CARVALHO e ANDRADE, 2006).

As metodologias de referência para controle de qualidade de vacinas, tradicionalmente envolvem técnicas de pré-tratamento de amostras onde a utilização de solventes, extração e/ou diálise de material excipiente assim como a digestão de amostras se faz necessária. Tais metodologias são caras, tediosas, insalubres, geram grandes quantidades de resíduos químicos e biológicos além de exigirem meticolosas manipulações na amostra, criando uma potencial fonte de erro analítico. Isto é, estas metodologias encontram-se hoje na contramão das tendências da Química Analítica Aplicada moderna (USP XXXVII, 2014).

Após a utilização do EDAC na conjugação do Polissacarídeo com a PMT para a formação do PSST, o EDAC residual que não participou da conjugação, e que não foi eliminado nas etapas de purificação, é tratado como impureza do produto. Segundo Brasil (2003), testes quantitativos ou ensaio limite, o que melhor for para garantir a qualidade do produto, podem ser aplicados para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

A técnica utilizada no Laboratório Físico-Químico de Bio-Manguinhos (LAFIQ) para a determinação de EDAC residual no PSTT utilizado na fabricação da vacina de Hib é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de UV utilizando comprimento de onda de 214 nm. É realizado um ensaio limite, em que a área do pico da amostra tem que ser menor que a área correspondente à concentração de 1,5 µg/mL do padrão de EDAC. O teor máximo de EDAC presente no intermediário foi determinado pela empresa GlaxoSmithKline (GSK) e transmitida a Bio-Manguinhos através de uma transferência de tecnologia e não foi, até a presente data, alterado pela mesma.

O ensaio limite tem como objetivo unicamente assegurar que a quantidade de EDAC no PSTT é inferior ao limite estabelecido pela norma de qualidade da vacina,

pré-determinada pela empresa no ato do estudo de desenvolvimento, não se preocupando com a real quantificação do EDAC.

A análise de EDAC em PSTT atual, segundo relatório de validação da análise pertencente a Bio-Manguinhos, tem limite de detecção de 79 ng/mL (79000 pg/mL) (cálculo teórico a partir da curva de calibração) e análises preliminares do PSTT utilizando espectrometria de massas, demonstraram um teor de aproximadamente 1000 pg/mL, cerca de 80 vezes a menos do que o limite de detecção da técnica que utiliza detector de UV.

O tratamento da amostra, assim como outros fatores que influenciam a técnica atual, contribui para uma apresentação de resultados que não permitem uma avaliação clara. O perfil cromatográfico não possui um formato constante e o limite de detecção da técnica atual é muito superior ao teor real de EDAC no PSTT.

Figura 12 - Amostra de PSTT (primeira injeção) analisada pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)

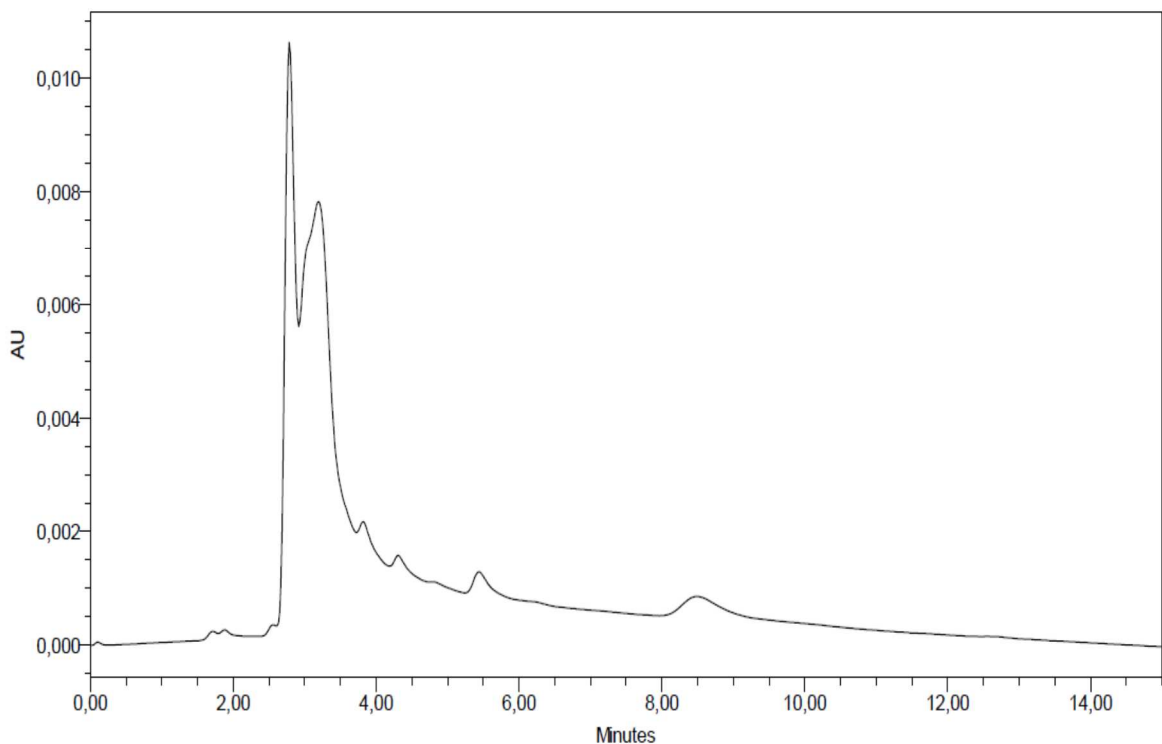


Figura 13 - Amostra de PSTT (segunda injeção) analisada pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)

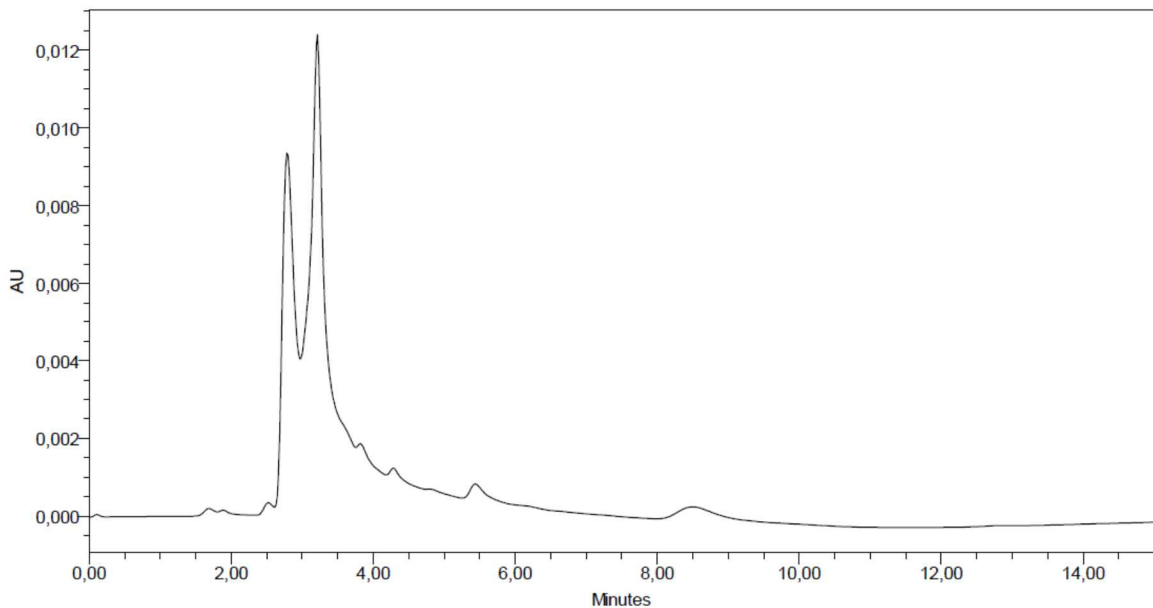
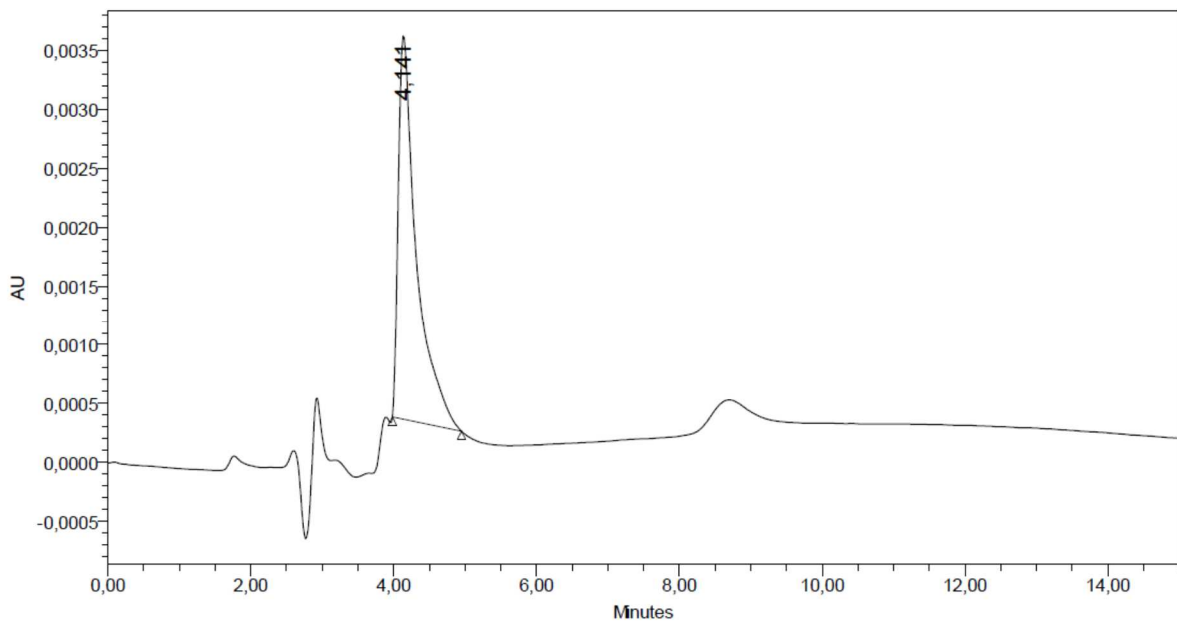
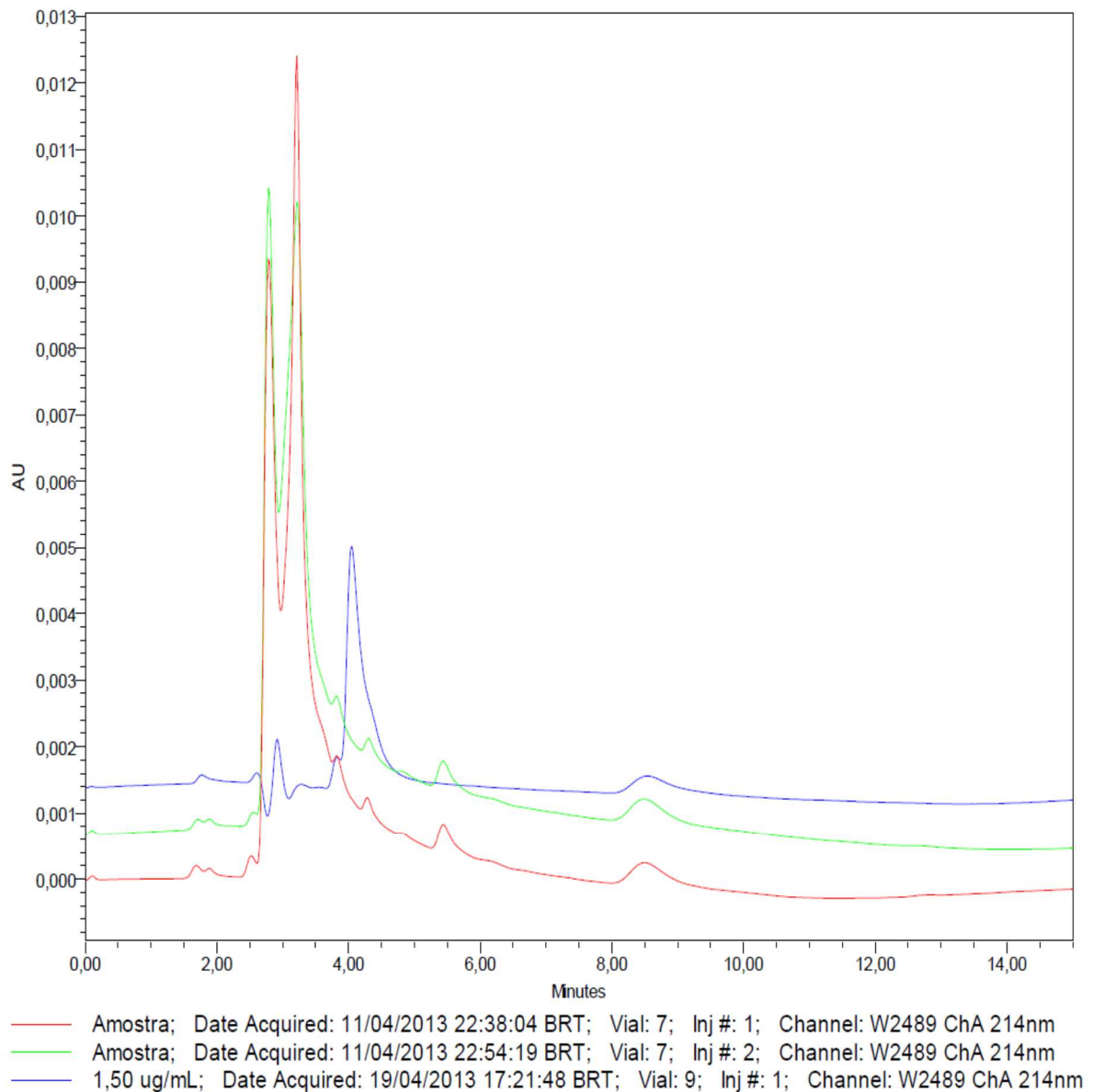


Figura 14 - Padrão de EDAC 1,5 µg/mL analisado pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)



As figuras 12 e 13 são cromatogramas de determinação de EDAC, em amostras de PSTT, utilizando a técnica atual e a figura 14 é um cromatograma de padrão de EDAC a 1,5 µg/mL utilizando a mesma técnica. É possível verificar nas figuras 12 e 13 que o perfil cromatográfico não se mantém estável na mesma amostra em injeções diferentes com apenas 16 minutos de diferença entre as injeções.

Figura 15 - Sobreposição das injeções da amostra de PSTT e do padrão de EDAC 1,5 µg/mL analisados pela metodologia de determinação de EDAC atual (HPLC/UV)



A figura 15 apresenta a sobreposição das injeções da amostra de PSTT e do padrão de EDAC a 1,5 µg/mL utilizando a metodologia atual. É possível mais uma vez verificar a leve alteração no perfil cromatográfico das amostras e que no tempo de retenção do padrão não é possível identificar a presença de EDAC na amostra.

As análises realizadas na vacina contra Hib são cruciais para garantir que a população tenha acesso a um produto com qualidade. O desenvolvimento de métodos de análise que diminuam a margem de erro e aumentem a confiabilidade dos

resultados, além de reduzir o tempo de liberação para o mercado, é uma meta constante em Bio-Manguinhos.

Devido aos baixos níveis de EDAC presentes no PSTT e à necessidade de se controlar, com eficácia, todas as substâncias utilizadas na síntese da vacina, juntamente com seus agentes contaminantes, segundo os órgãos de regulamentação e fiscalização, é preciso estabelecer outra técnica que proporcione uma maior velocidade na análise e uma maior confiabilidade nos resultados da rotina do controle de qualidade da vacina. Como a espectrometria de massas é uma técnica que permite a identificação e quantificação de pg/mL (ppt), a mesma se torna uma técnica recomendada para a análise do EDAC em PSTT.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para identificação e quantificação do EDAC residual em preparações da vacina contra Hib.

2.2. OBJETIVO ESPECIFICO

- Desenvolver metodologia de controle físico-químico para resíduos de EDAC ainda permanentes no PSTT após etapas de purificação do produto intermediário.
- Avaliar figuras analíticas de mérito que levem à validação parcial do método proposto: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e robustez.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho encontram-se relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Reagente/Solvente	Grau	Fornecedor
Acetato de Amônio	P.A.	Merck
Acetonitrila	LC/MS	J. T. Baker
Água	LC/MS	J. T. Baker
EDAC	-----	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Amônio	P.A.	Merck

3.1.2. Amostras

O PSTT utilizado neste trabalho foi inteiramente produzido em Bio-Manguinhos e o lote utilizado foi obtido a partir do arquivo do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico do Instituto (LAFIQ), dentro da vigência do prazo de validade, e devidamente aprovado pelos métodos oficiais preconizados nos compêndios oficiais. As informações sobre o PSTT (número de lote, validade entre outras) foram solicitadas por Bio-Manguinhos a não serem divulgadas na dissertação em razão da necessidade de preservação da propriedade industrial.

Desde o recebimento até a completa execução dos experimentos deste trabalho a amostra utilizada permaneceu estocada em câmara fria a uma temperatura

de 2 a 8°C, sendo retirada desta condição apenas para a realização dos testes. Este procedimento foi adotado a fim de garantir as mesmas condições de armazenamento do PSTT.

A amostra foi pré-tratada através de ultracentrifugação, utilizando membranas AMICON Ultra-4 de 100 K. Foi centrifugada por 22 minutos com uma força G de 5762 G e, logo depois, diluída na razão de 1:1 com a fase móvel antes de ser colocada no *vial*.

3.1.3. Equipamento

Para o desenvolvimento do estudo foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência acoplado a um espectrômetro de massas Waters (Acquity Ultra Performance LC) (figura 16). A coluna analítica utilizada foi a ACQUITY UPLC BEH C18 com 1,7µm de tamanho de partícula, 50 X 2,1mm e o programa de gerenciamento dos dados foi o MassLynx 4.1®.

Figura 16 - Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência da Waters acoplado ao espectrômetro de massas (Acquity Ultra Performance LC).



3.2. OTIMIZAÇÃO DO METODO.

3.2.1. Otimização da Fase Móvel

Durante o desenvolvimento do trabalho foram avaliadas diferentes proporções de fase móvel:

- 1) 85% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 15% ACN;
- 2) 60% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 40% ACN;
- 3) 30% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 70% ACN;
- 4) 20% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN.

Os Monitoramentos de Reações Múltiplas (MRM) para a transição m/z 156>86 foram avaliados e a fase móvel foi determinada.

3.2.2. Otimização da Temperatura

Como o EDAC sofre degradação térmica, como já descrito no item 1.2.3, a utilização de temperaturas mais elevadas para a otimização da análise foi descartada. Com a finalidade apenas de conter a flutuação de temperatura durante a análise, levando em consideração que a temperatura média do laboratório é de 25°C, evitando assim mudança no tempo de retenção do EDAC, foi estabelecida a temperatura de 30°C para o forno da coluna durante toda a análise.

3.2.3. Parâmetros do Espectrômetro de Massas

Os parâmetros do equipamento que foram utilizados para o monitoramento do EDAC são: fonte de ionização por eletrospray operando em modo positivo (ESI+) e transições de MRM m/z 156> 86 e 156> 58 para monitoramento das transições entre

o íon precursor e os íons produtos. A temperatura da fonte foi de 150°C e a de dessolvatação de 500° C. O fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram de 30 e 1000 L/h, respectivamente, os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 0,5 kV, 23,0 V e 3,0 eV. A voltagem do extrator (localizado entre a fonte e o primeiro quadrupolo, tendo a função de conduzir os íons entre os dois) foi de 3 V e a vazão do gás argônio para a dissociação foi de 0,19 mL/min.

3.2.4. Teste Miscibilidade

Para testar um possível aumento na estabilidade do EDAC durante o período de análise foi testada a miscibilidade do EDAC e do PSTT em fase móvel, já que a mesma é constituída de um tampão e 80% de solvente orgânico.

3.2.5. Avaliação da estabilidade do EDAC

A avaliação foi realizada através de injeções consecutivas. Foram programadas 237 injeções, com duração de 2 minutos e intervalos entre injeções de 1 min, totalizando aproximadamente 12 h, da solução de EDAC a 1,00 ng/mL diluídas com água tipo Milli-Q. A mesma avaliação foi realizada nas mesmas condições só que com a solução de EDAC a 1,00 ng/mL diluída com fase móvel 20% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN.

3.3. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

As figuras analíticas de mérito, também denominados de parâmetros analíticos, características de desempenho ou parâmetros de desempenho analítico, 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).

3.3.1. 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);
- 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 de calibração com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva de calibração, sem a presença da matriz;
- 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. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011).

Para avaliar a seletividade foi preparada uma solução contendo PMT e PRRP, nas mesmas proporções utilizadas na formação do PSTT em produção. Essa solução foi injetada nas mesmas condições cromatográficas da amostra. Foram obtidos espectros de massas da solução sem contaminação e da solução contaminada com 2 µg/mL de EDAC. Também foi obtida uma curva de calibração do padrão de EDAC e uma curva de adição padrão sobre a amostra de PSTT. O objetivo foi verificar se o sinal utilizado para a quantificação do EDAC sofreu ou não interferência dos outros componentes da formulação.

Devido à baixa concentração do EDAC foi preparada uma solução padrão-estoque (com validade de apenas um dia) na concentração de 10 ng/mL e as diluições tanto para a curva padrão quanto para a curva de adição padrão foram realizadas diretamente nos *vials* de 1,5 mL. Todas as diluições foram realizadas com micropipetas de volume variável. Na tabela 2 está descrito como foram estruturadas as curvas para avaliar a seletividade.

Tabela 2 - Tabela descrevendo a preparação da curva de padrão e de adição padrão de EDAC para avaliação da seletividade.

Curva Padrão		
Solução Padrão (10 ng/mL)	Fase móvel	Concentração estimada
10 µL	990 µL	100 pg/mL
20 µL	980 µL	200 pg/mL
30 µL	970 µL	300 pg/mL
40 µL	960 µL	400 pg/mL
50 µL	950 µL	500 pg/mL
60 µL	940 µL	600 pg/mL
70 µL	930 µL	700 pg/mL
Curva de Adição Padrão		
Solução Padrão (10 ng/mL)	Fase móvel	Amostra (PSTT)
0 µL	500 µL	500 µL
10 µL	490 µL	500 µL
20 µL	480 µL	500 µL
30 µL	470 µL	500 µL
40 µL	460 µL	500 µL

3.3.2. 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 Ultra Eficiência (CLUE), 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 de calibração 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).

Para avaliar a linearidade do método foram construídas três curvas de calibração independentes, com sete níveis de concentração do padrão. Foi preparada uma solução padrão-estoque a 10 ng/mL de EDAC na fase móvel de trabalho, e a partir desta, os pontos da curva foram preparados seguindo as diluições indicadas na tabela 3, diretamente em *vials* de 1,5 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 - Preparo dos pontos da curva de calibração para a avaliação da linearidade do método.

	Concentração teórica (pg/mL)	Volume da Solução Padrão-estoque (μ L)	Volume de Fase móvel (μ L)
P1	100	10	990
P2	200	20	980
P3	300	30	970
P4	400	40	960
P5	500	50	950
P6	600	60	940
P7	700	70	930

3.3.3. Limites de Detecção e Quantificação

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:

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

IC = inclinação da curva de calibração.

- Com base em parâmetros da curva de calibração: uma curva de calibração 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®. 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 de calibração.

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. O LQ pode ser calculado a partir da equação (BRASIL, 2003):

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

Onde:

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

IC = inclinação da curva de calibração.

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 de calibração, utilizando a relação 10:1 (RIBANI *et al.*, 2004).

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

3.3.4. 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.

Para avaliar a exatidão do método foi realizado um ensaio de recuperação, onde foram adicionadas quantidades conhecidas de EDAC na amostra. Foram

preparados quatro *vials* de 1,5 mL contendo 500 μ L de amostras, os quais foram fortificados com EDAC, conforme a tabela 4. Paralelamente, construiu-se uma curva de calibração e foi preparada uma amostra de vacina sem adição de EDAC para avaliar a exatidão do método, através da recuperação média das amostras fortificadas.

Tabela 4 - Curva de adição padrão de EDAC para o ensaio de recuperação

Curva de Adição Padrão			
Solução Padrão (10 ng/mL)	Volume de Fase móvel	Volume de Amostra (PSTT)	Concentração estimada
0 μ L	500 μ L	500 μ L	Amostra
10 μ L	490 μ L	500 μ L	Amostra + 100 pg/mL
20 μ L	480 μ L	500 μ L	Amostra + 200 pg/mL
30 μ L	470 μ L	500 μ L	Amostra + 300 pg/mL
40 μ L	460 μ L	500 μ L	Amostra + 400 pg/mL

3.3.5. 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).

A robustez do método foi testada de duas formas. Na primeira, a temperatura da coluna foi alterada em dois estágios, de 30°C para 25°C e depois para 35°C e todas as outras demais condições mantidas. A curva de calibração nas concentrações definidas neste trabalho e seis preparos de amostra de PSTT foram analisadas. Na segunda o pH foi alterado também em dois estágios, de 10,0 para 9,5 e depois para 10,5 e as demais condições mantidas. As concentrações assim obtidas, tanto na primeira quanto na segunda modificação, foram comparadas com as obtidas nas amostras analisadas pelo método proposto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. OTIMIZAÇÃO DO METODO.

4.1.1. Otimização da Fase Móvel

Foram avaliadas quatro diferentes proporções de fase móvel. A otimização levou em conta a total resolução entre os picos que eluíram na amostra e os menores tempos de retenção. As figuras 17,18,19 e 20 demonstram os monitoramentos de

reações múltiplas (MRM), da transição m/z 156>86, de cada fase móvel testada, onde a proporção de ACN foi alterada para se obter o melhor resultado.

Figura 17 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 85% $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 1mmol/L (pH 10,0) + 15% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30°C / Fluxo: 0,3 mL/min.

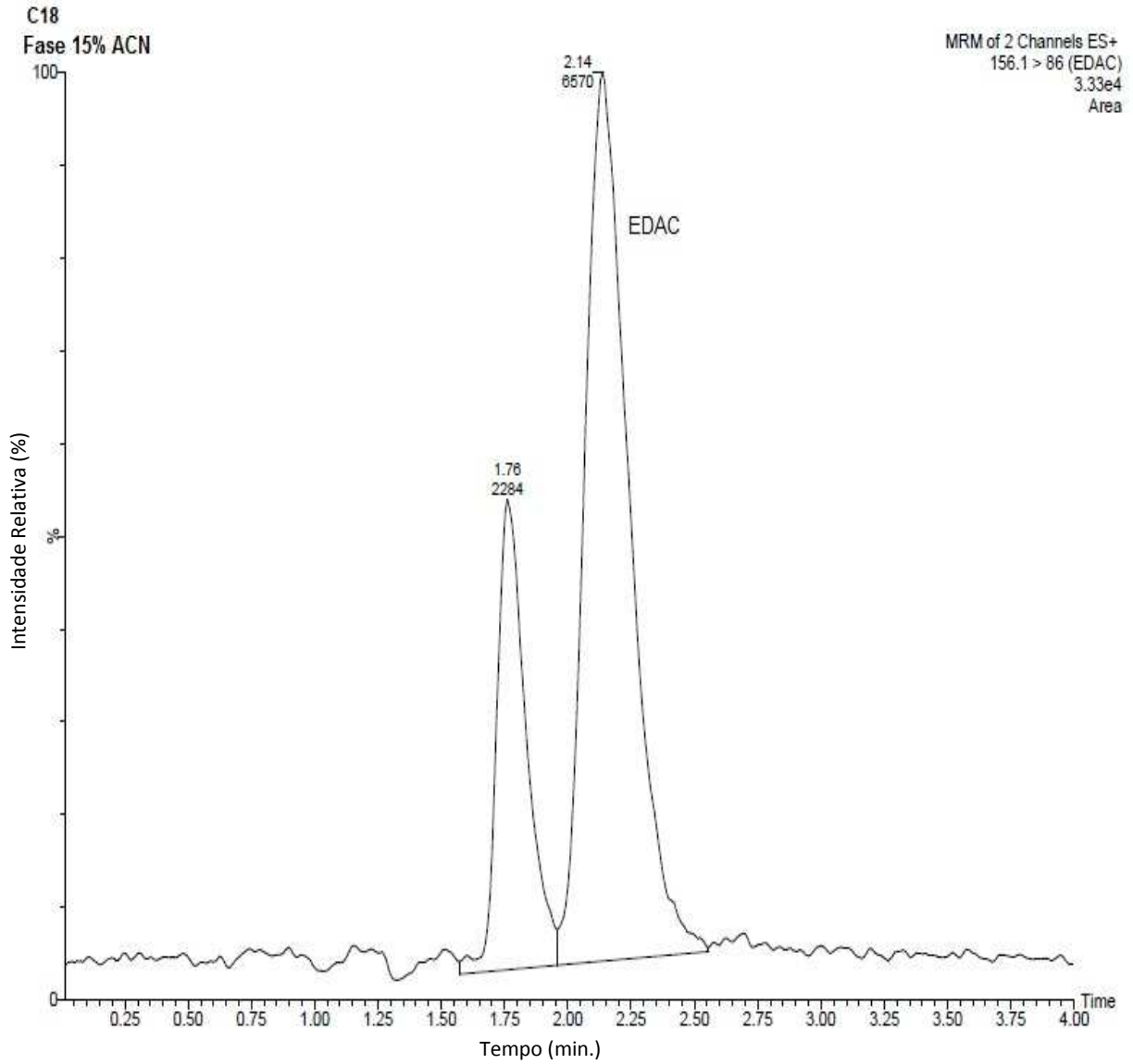


Figura 18 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 60% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 40% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30°C / Fluxo: 0,3 mL/min.

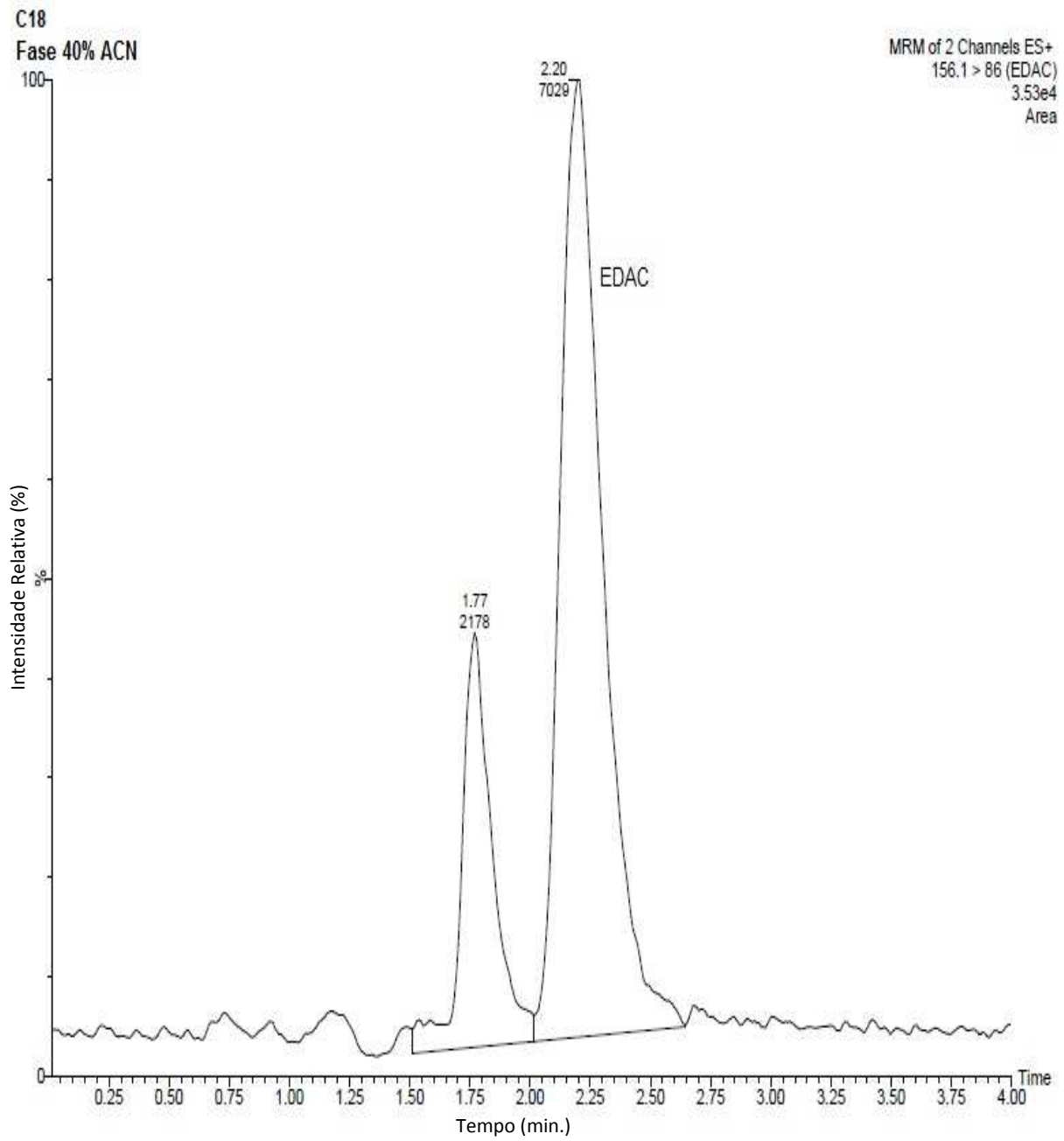


Figura 19 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 30% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 70% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30°C / Fluxo: 0,3 mL/min.

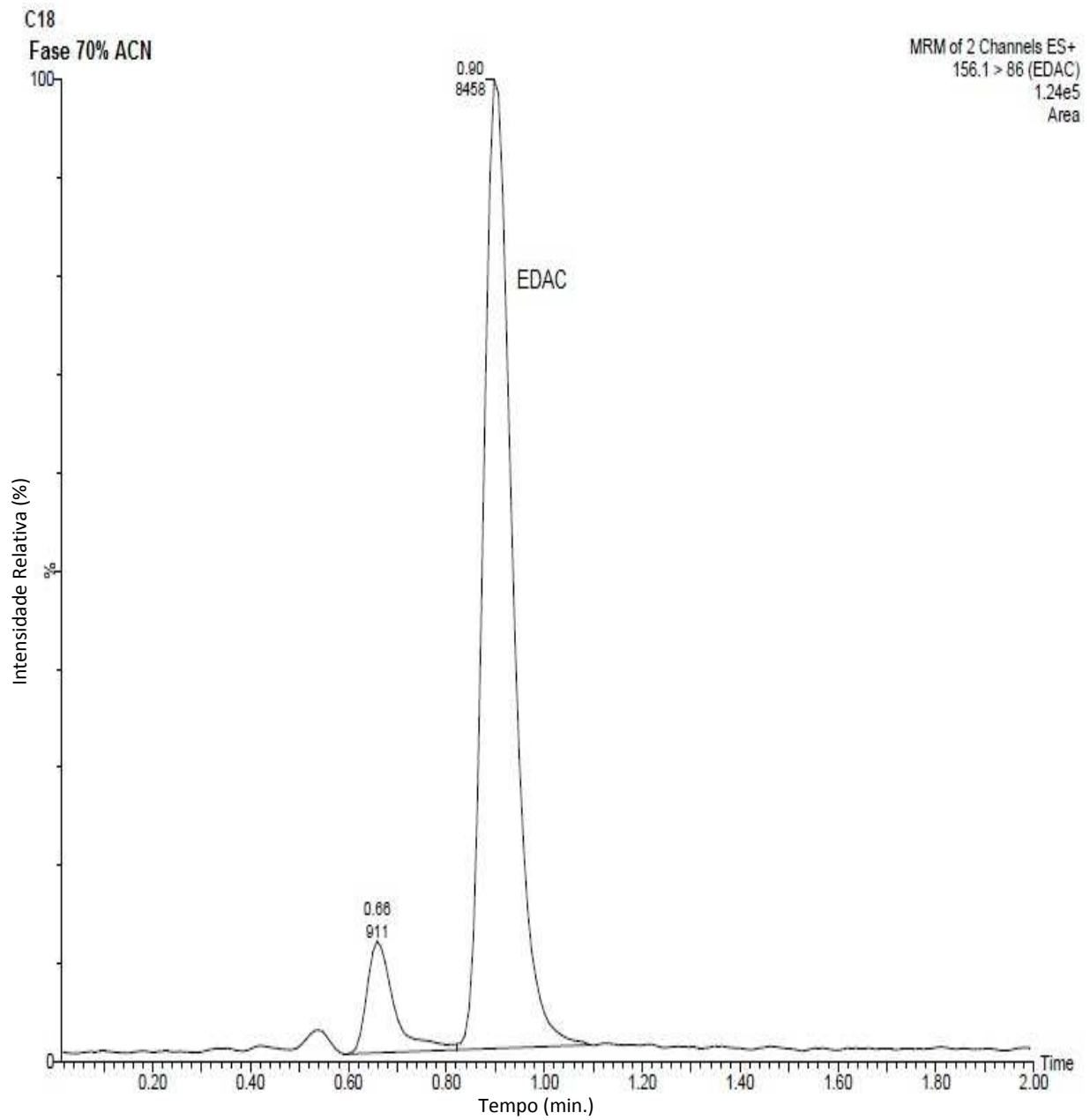
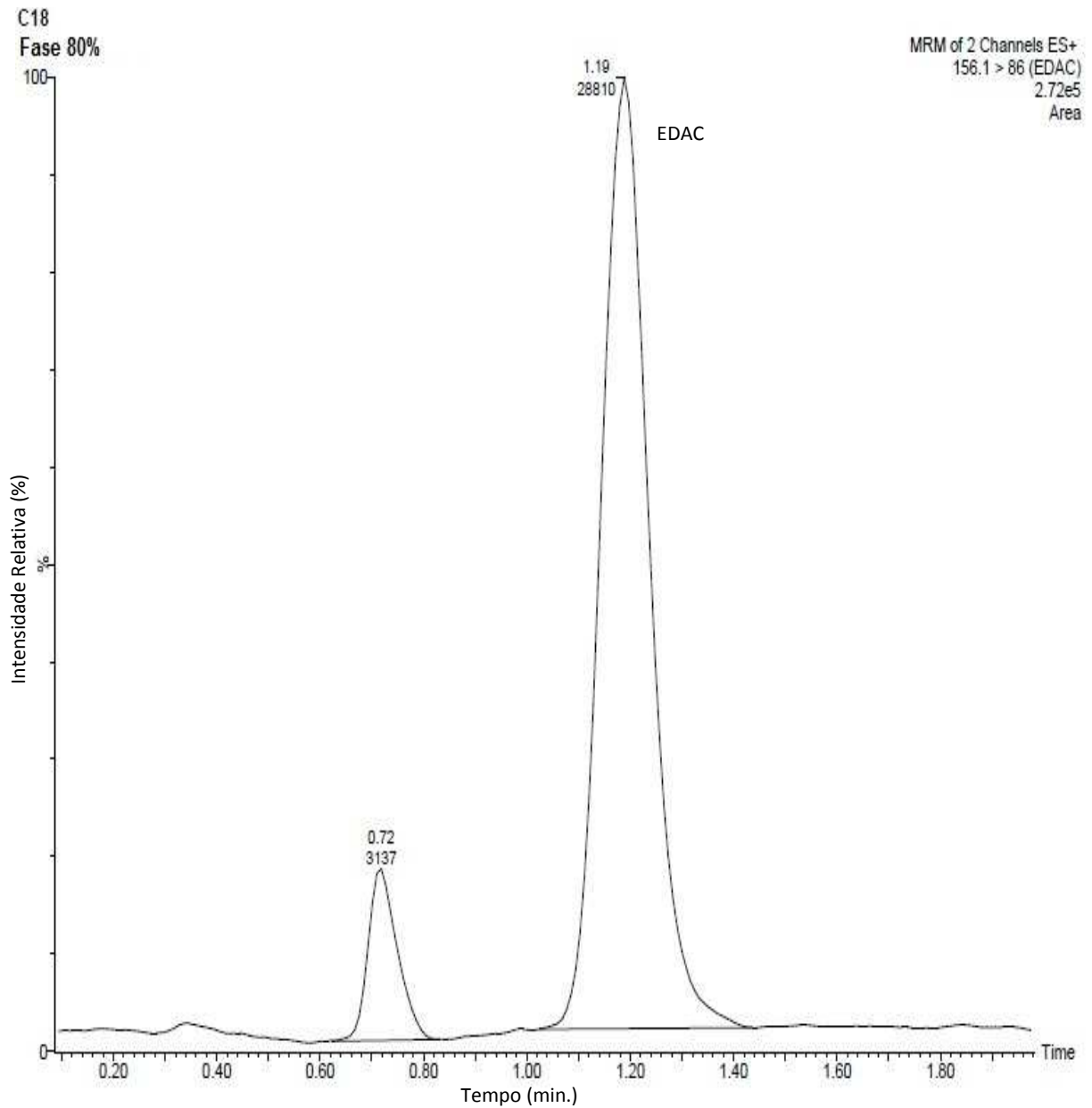


Figura 20 - Otimização da fase móvel – Fase móvel: 20% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN - MRM 156>86 / Temperatura do forno: 30°C / Fluxo: 0,3 mL/min.



Das resoluções obtidas nas diferentes proporções da fase móvel, o resultado escolhido foi o considerado com resolução calculada acima de 1,8 ($R \geq 1,8$), sendo a fase contendo 20% H₃CCOONH₄ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN (figura 20) apresentando o melhor resultado.

4.1.2. Otimização da Temperatura

Como já descrito no item 3.2.2. o EDAC se trata de uma substância termo sensível, e por esse motivo, para não haver riscos de uma possível degradação, a utilização de temperaturas mais elevadas do que 30°C para as análises foi descartada.

4.1.3. Parâmetros do Espectrômetro de Massas

O espectrômetro de massas foi ajustado para que se pudesse observar a melhor intensidade do sinal das transições m/z 156>86 e m/z 156>58. Essas foram escolhidas a partir da varredura de íons produto (*Productlon Scan*) a partir do íon precursor m/z 156 (EDAC) onde o mesmo é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), fragmentado na câmara de colisão (Q2), tendo o terceiro quadrupolo (Q3) funcionando em modo varredura (*Scan*) para obtenção do espectro de íons produto (figura 21). As transições m/z 156>86 e m/z 156>58 foram escolhidas porque surgiram respectivamente com maior intensidade. A figura 22 mostra o espectro de íons produto para o íon m/z 156.

Figura 21 - Demonstração da varredura de íon Produto (*Productlon Scan*) (BUSTILLOS, 2003).

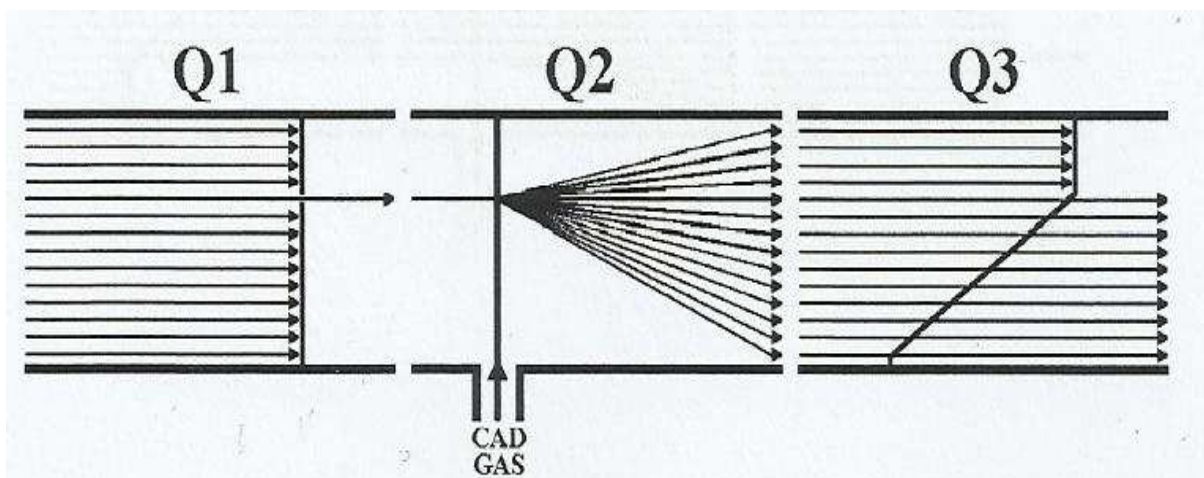
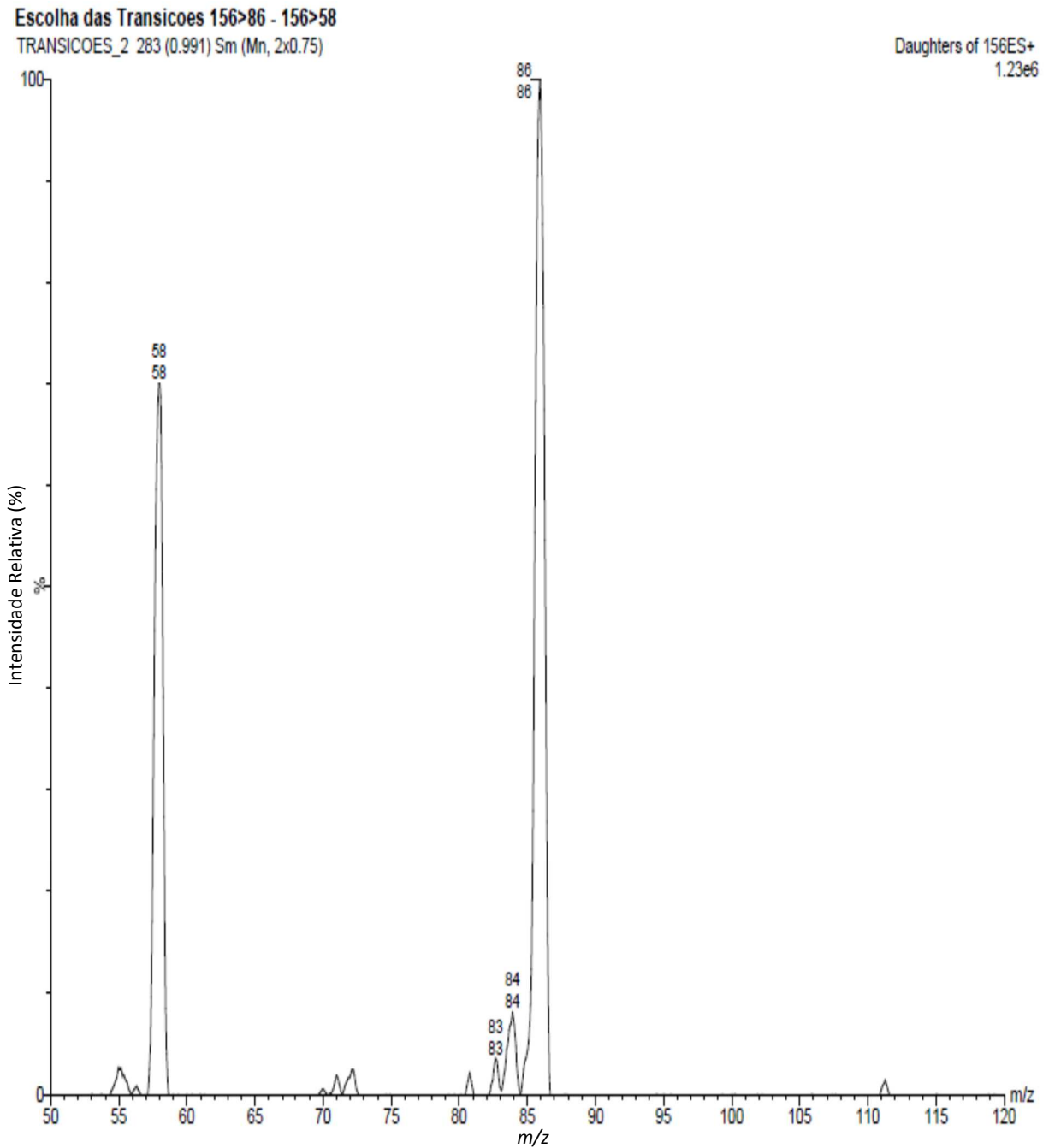


Figura 22 - Espectro de íon produto (*Production Scan*) do EDAC para o íon m/z 156



A transição m/z 156>86 por possuir a maior intensidade ($1.02E6$) foi utilizada como a transição para quantificação (figura 23), já a transição m/z 156>58, que teve a segunda maior intensidade ($6.76e5$), em relação a transição m/z 156>86, foi utilizada para confirmação (figura 24).

Figura 23 - Cromatograma de íons extraídos - Transição m/z 156>86 (intensidade 1.02E6)

Escolha das Transicoes 156>86 - 156>58

transicoes_2 1 (0.004) Sm (Mn, 2x0.75)

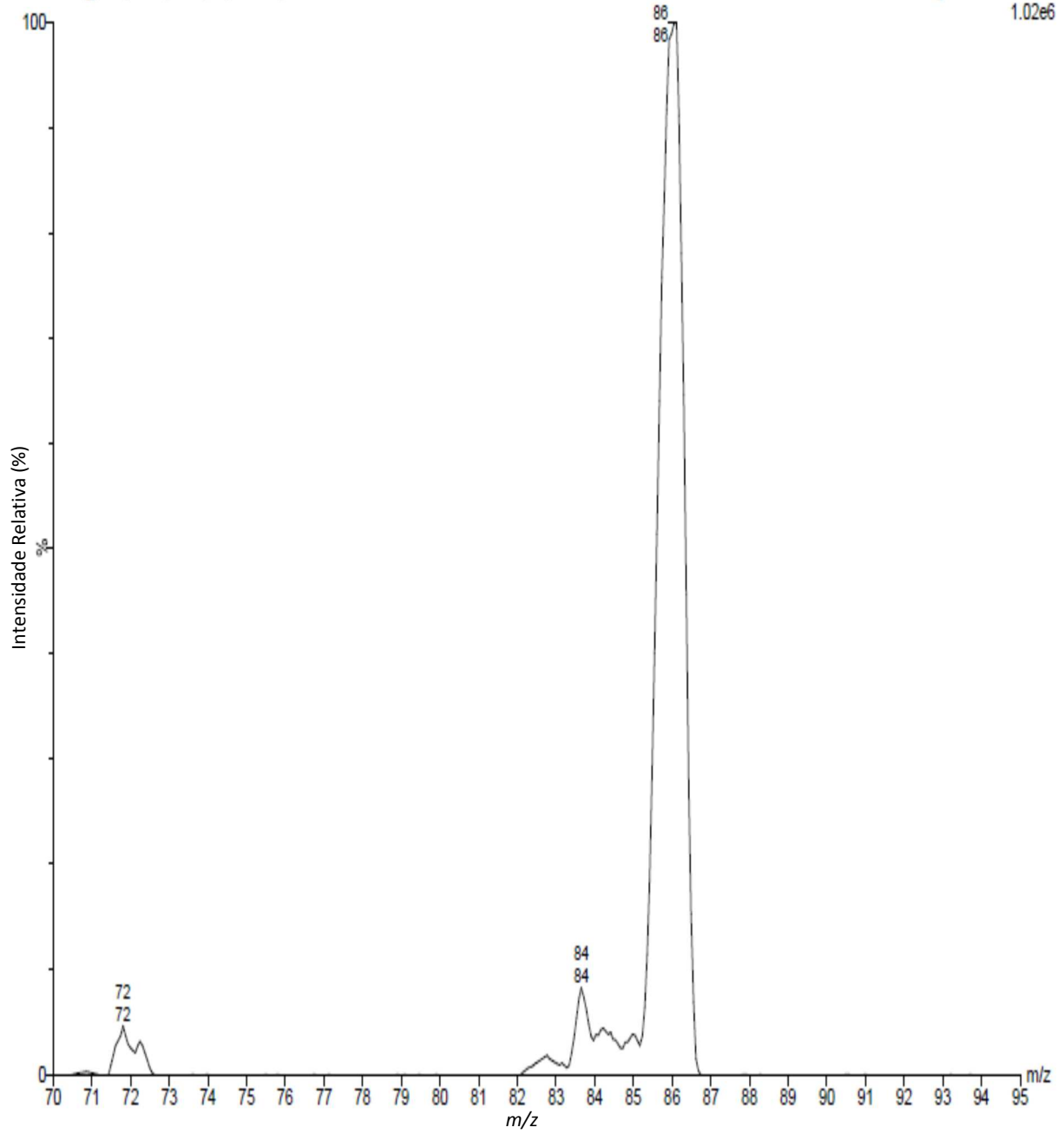
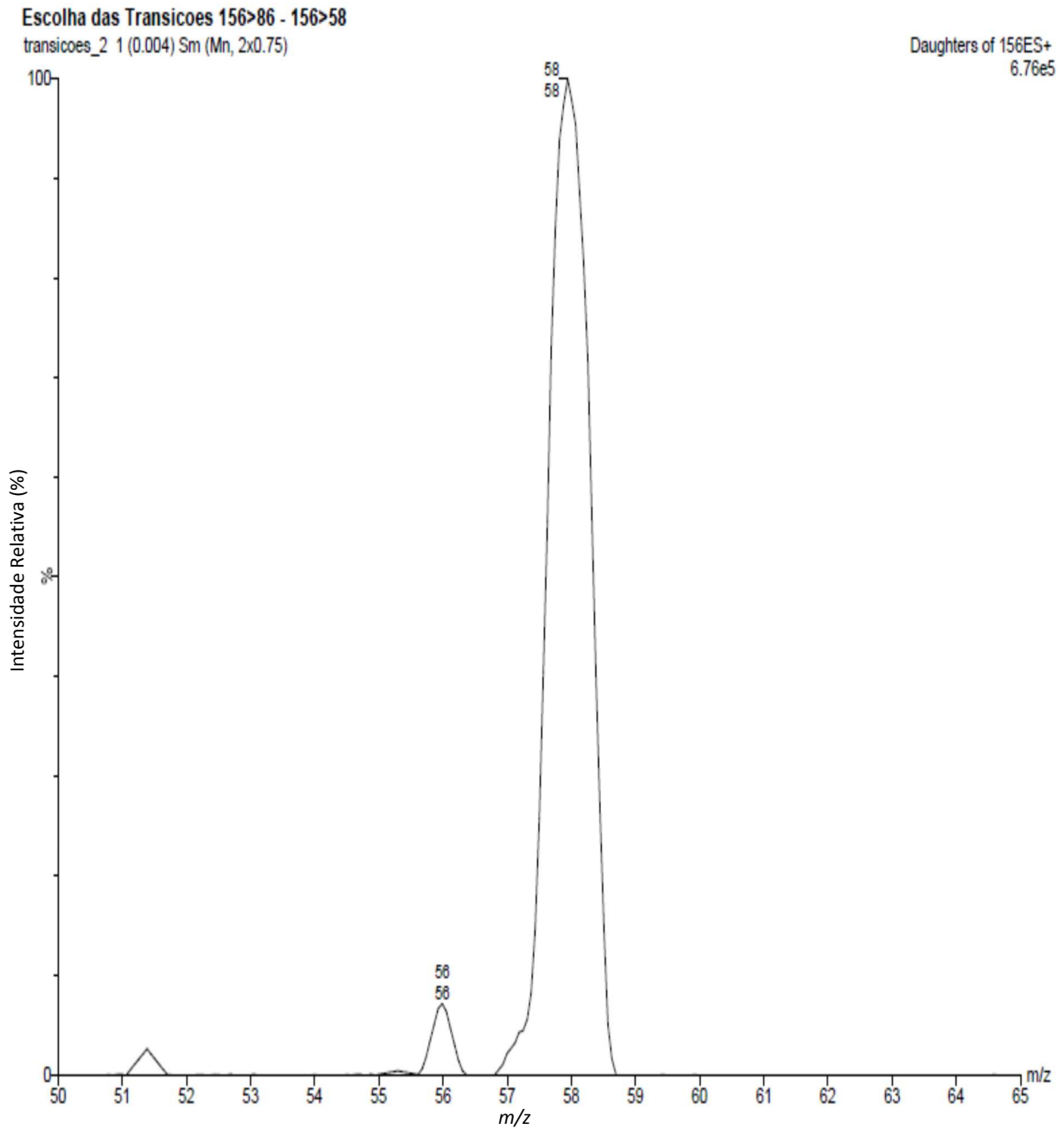
Daughters of 156ES+
1.02e6

Figura 24 - Cromatograma de íons extraídos - Transição m/z 156>58 (intensidade 6.76E5)



4.1.4. Teste Miscibilidade

A miscibilidade do EDAC em água já é amplamente conhecida na literatura técnica e também, como já descrito no item 1.2.3, o mesmo sofre degradação em meio aquoso. Na tentativa de aumentar a estabilidade do EDAC durante o período de

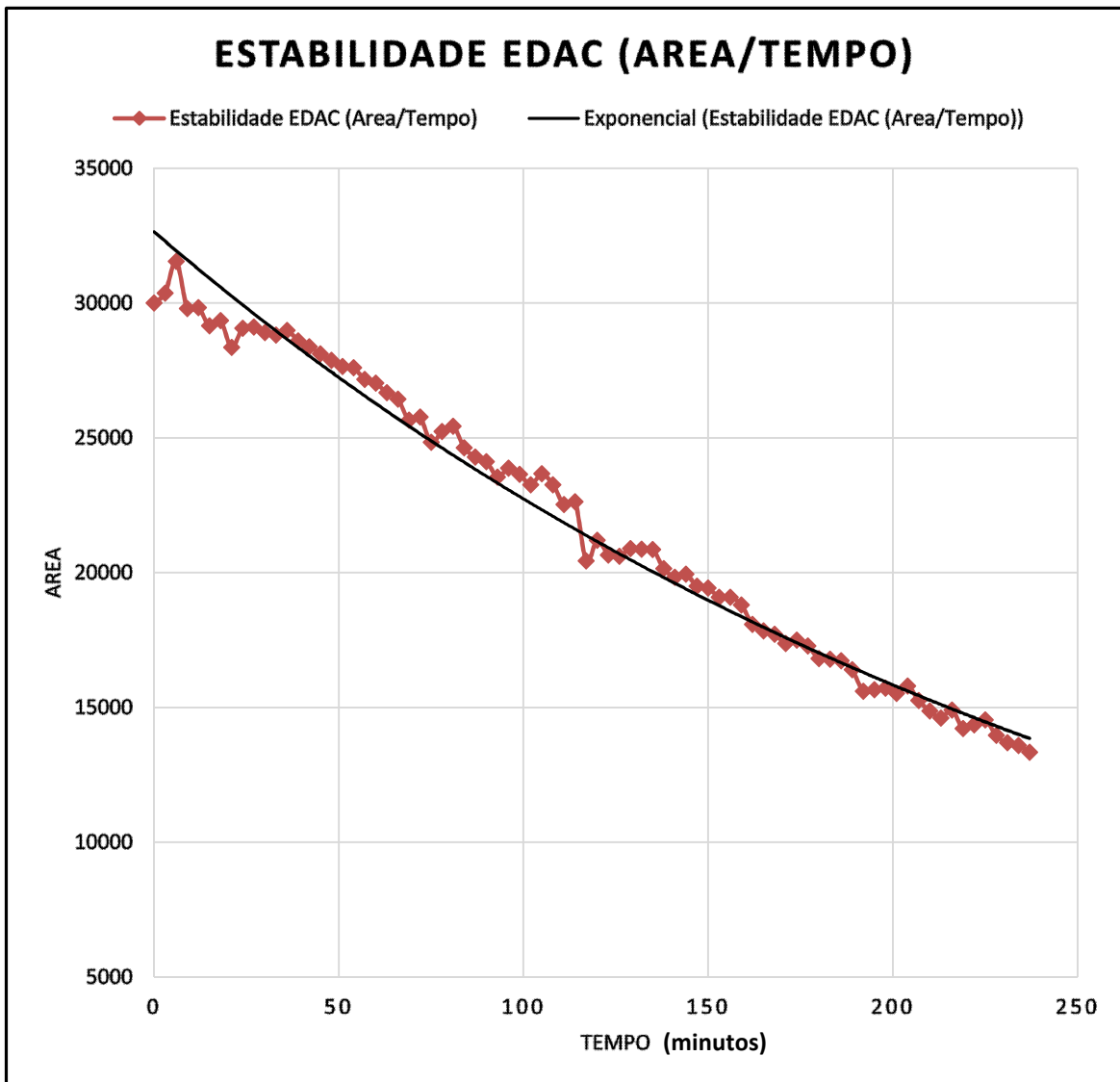
análise foi realizado o teste de miscibilidade do padrão de EDAC e da amostra de PSTT na fase móvel escolhida para o trabalho, apenas para garantir que não haja precipitação da substância no sistema cromatográfico. O teste foi considerado muito significativo, já que o padrão de EDAC e a amostra de PSTT foram amplamente solúveis na fase móvel de trabalho.

4.1.5. Avaliação da estabilidade do EDAC

A avaliação da estabilidade do EDAC foi realizada após 80 injeções sucessivas. Cada injeção teve duração de 2 minutos e intervalos, entre elas, de 1 min totalizando, aproximadamente, um período de 4 horas de avaliação. O período utilizado foi considerado como superior ao tempo necessário para realizar uma análise de rotina e, por esse motivo, não se achou necessário ultrapassar esse tempo. A avaliação foi realizada com uma solução de EDAC em meio aquoso e com uma solução de EDAC preparada com a fase móvel de trabalho que continha 80% de ACN e 20% de tampão acetato de amônio 1 mmol/L com pH 10,00.

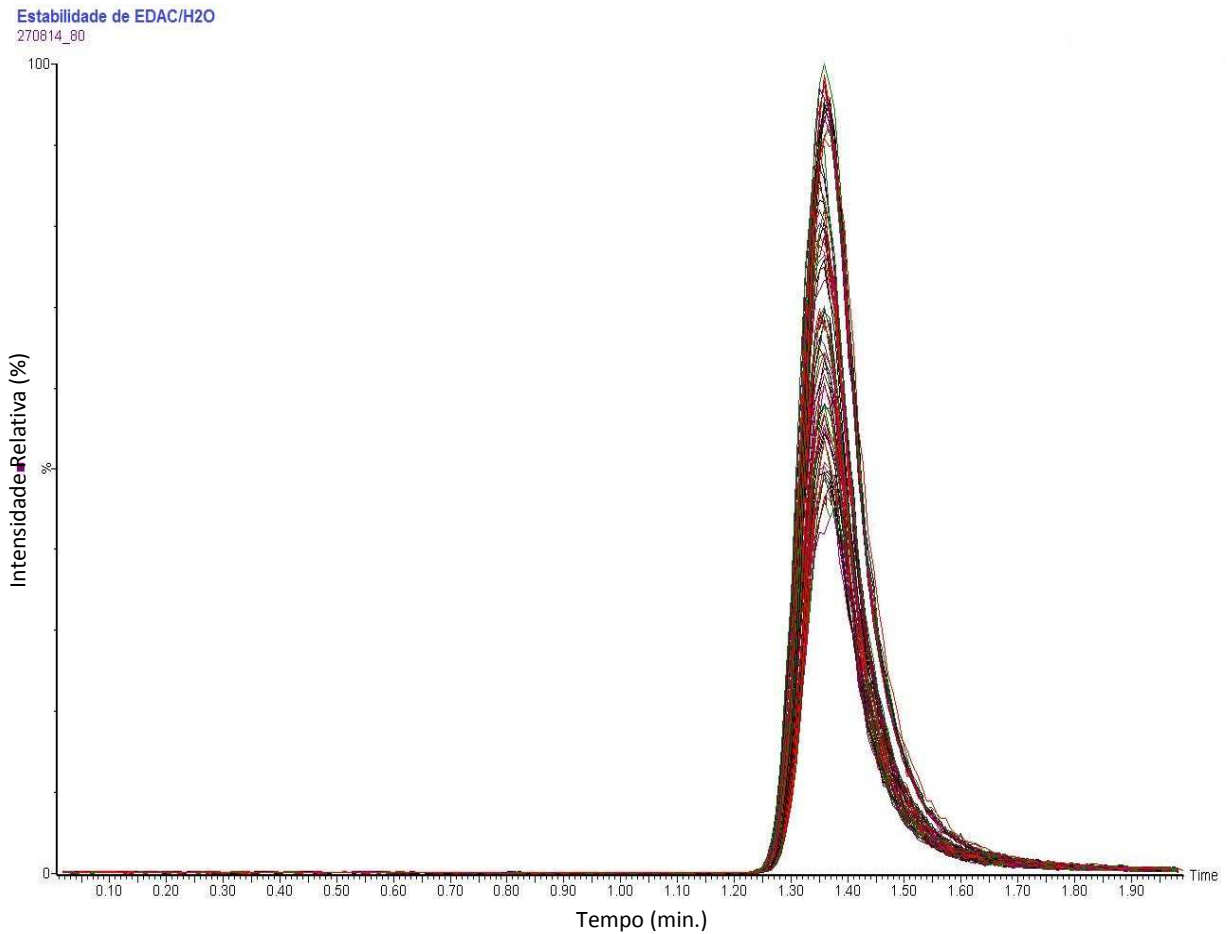
Devido à degradação acelerada do EDAC em meio aquoso, a primeira avaliação foi realizada neste meio para que se pudesse realizar a comparação. A figura 25 consiste em um gráfico de área versus tempo comprovando a instabilidade e a degradação do EDAC em meio aquoso.

Figura 25 - Gráfico da estabilidade do EDAC em meio aquoso a 25°C.



Através da figura 26, também é possível verificar a queda da intensidade do sinal do EDAC durante o período das 80 injeções.

Figura 26 - Demonstração da intensidade do sinal do EDAC em meio aquoso.



A mesma avaliação foi realizada utilizando as mesmas condições cromatográficas, sendo modificada apenas a preparação da solução de EDAC a 1,00 ng/mL, diluída com a fase móvel de trabalho que possui 20% $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 1mmol/L (pH 10,0) + 80% ACN.

A figura 27 é um gráfico de área versus tempo e demonstra a estabilidade do EDAC na fase móvel durante o período de avaliação. Na figura 28, pode ser observado que não houve queda significativa da intensidade do sinal do EDAC.

Figura 27 - Gráfico da estabilidade do EDAC em fase móvel a 25°C.

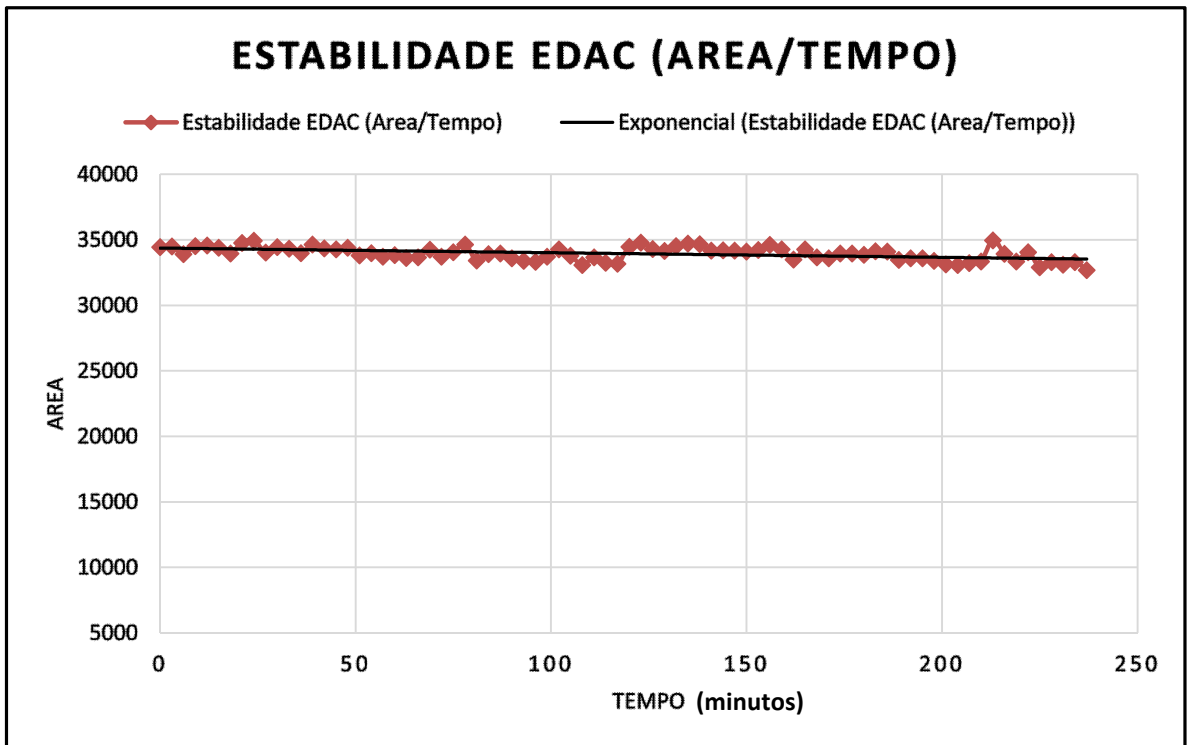
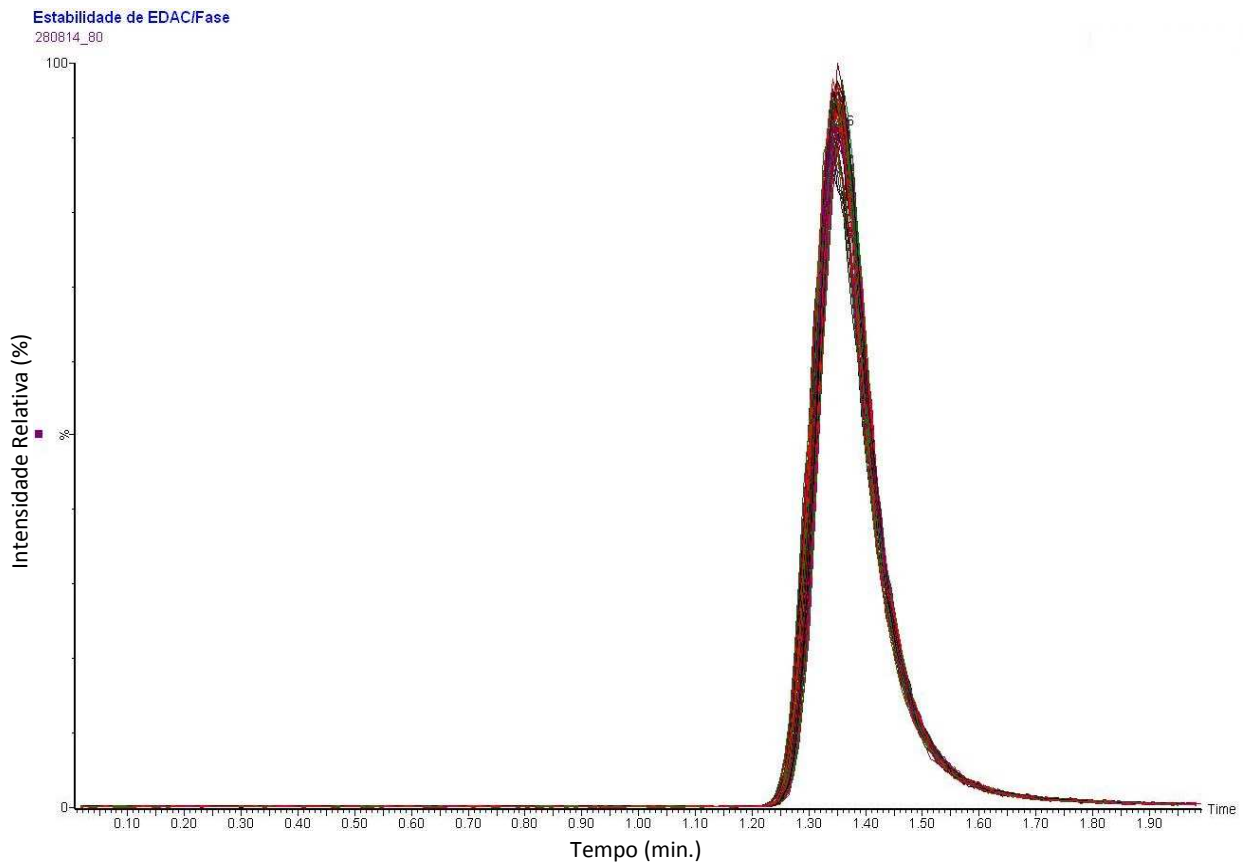


Figura 28 - Demonstração da intensidade do sinal do EDAC em fase móvel.

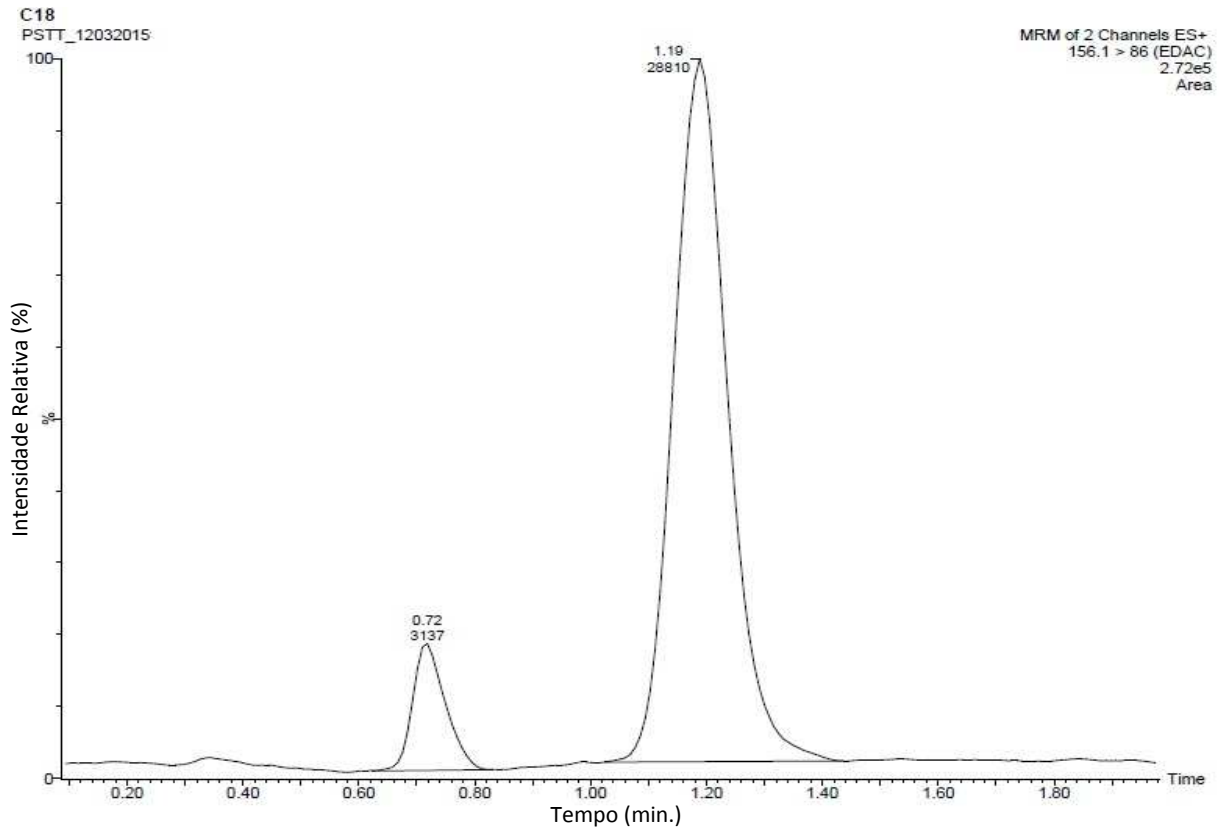


4.2. AVALIAÇÃO DAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

4.2.1. Seletividade

A seletividade foi a primeira figura de mérito a ser avaliada na metodologia proposta para a análise de EDAC. Foi realizada a injeção de uma amostra de PSTT e o cromatograma obtido pode ser observado na figura 29. Pode ser visualizado o pico de interesse, bem como identificar o seu respectivo tempo de retenção (1,19 min).

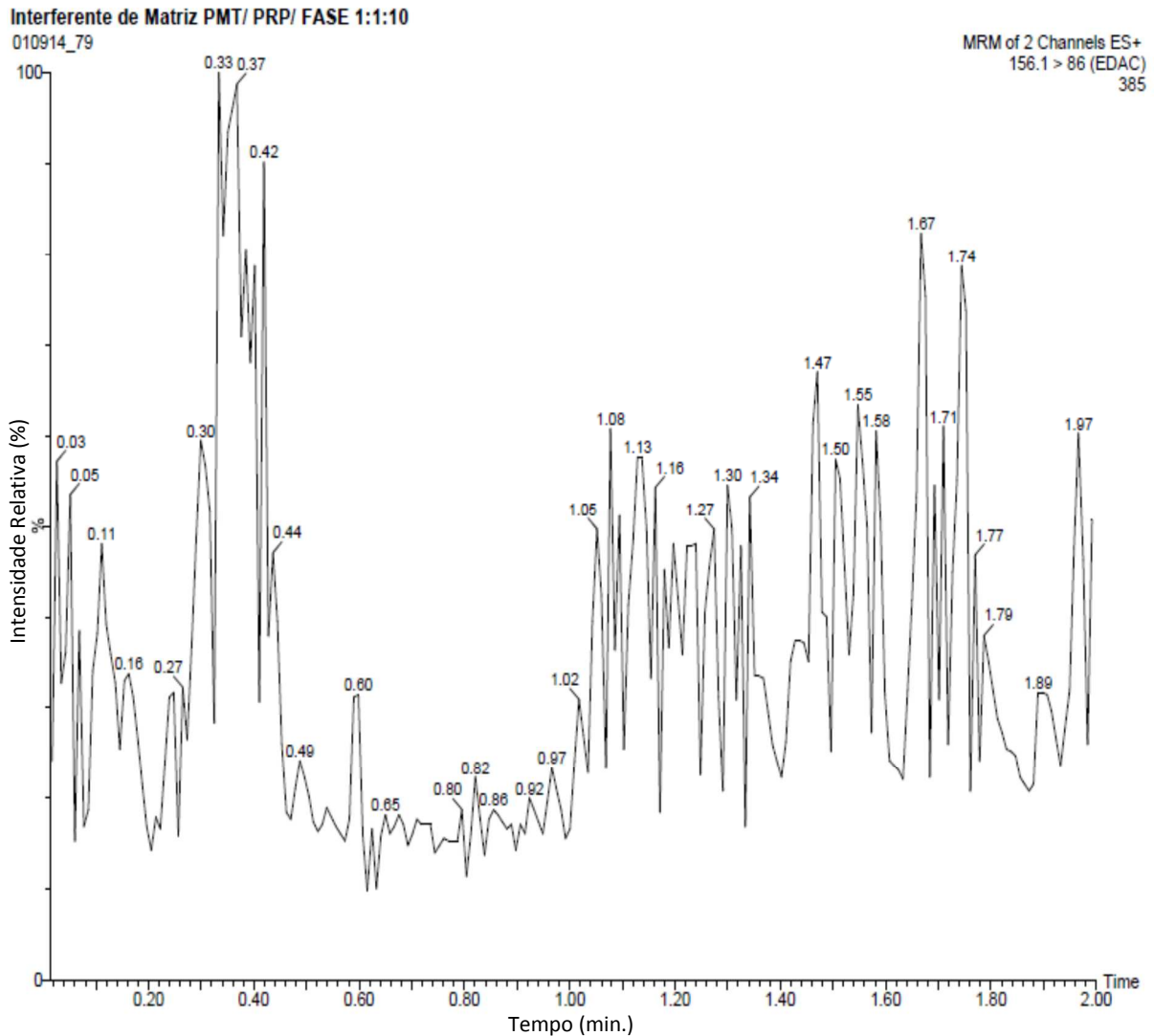
Figura 29 - Cromatograma de uma amostra de PSTT



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, foi preparada uma solução contendo PMT

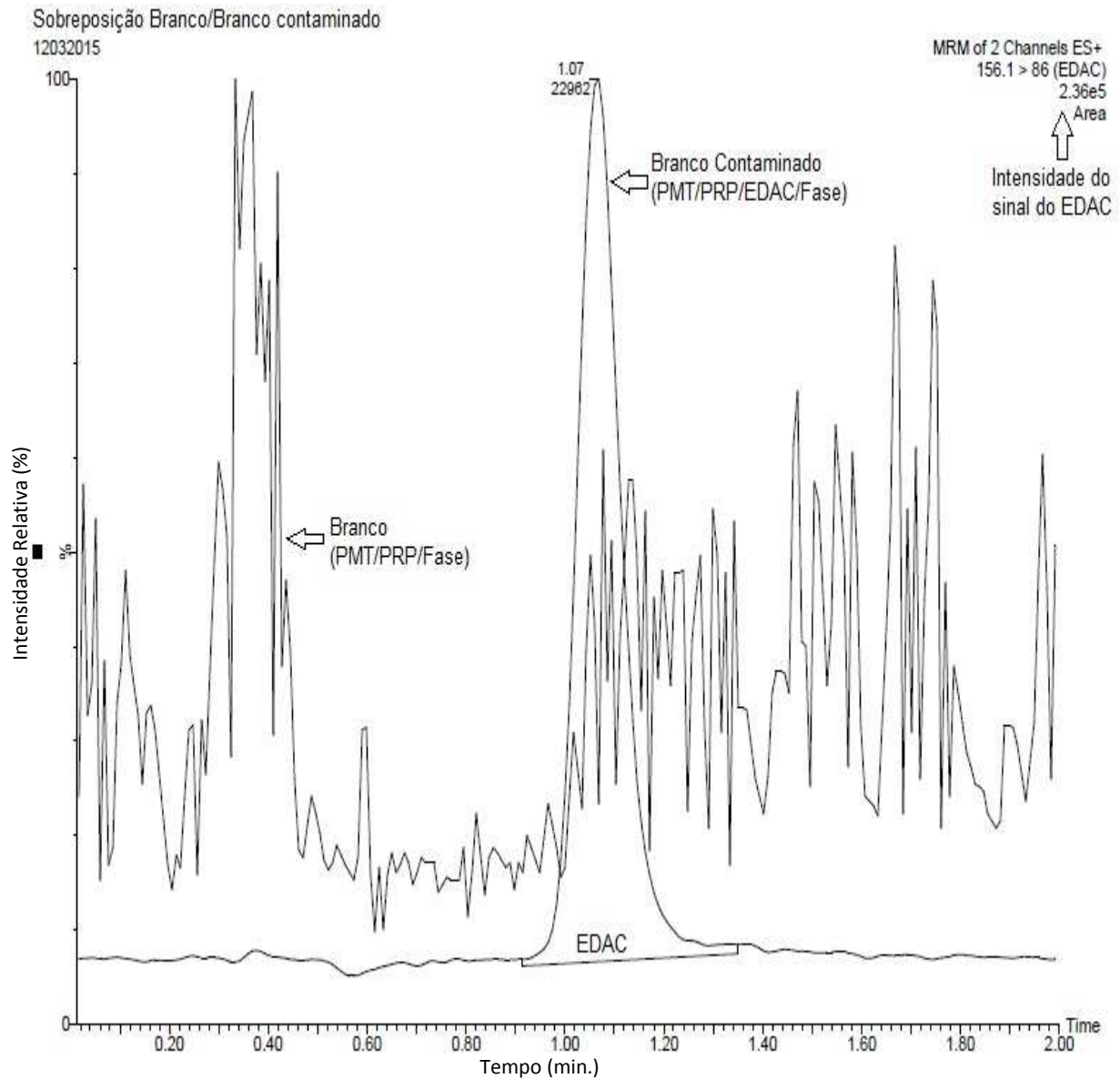
e PRRP na mesma proporção utilizada na produção do PSTT (branco) buscando-se avaliar, qualitativamente, se os constituintes utilizados na formulação interferiam ou não no desempenho da medição, coeludindo com o sinal do pico de interesse (figura 30).

Figura 30 - Solução contendo PMT e PRRP (Branco)



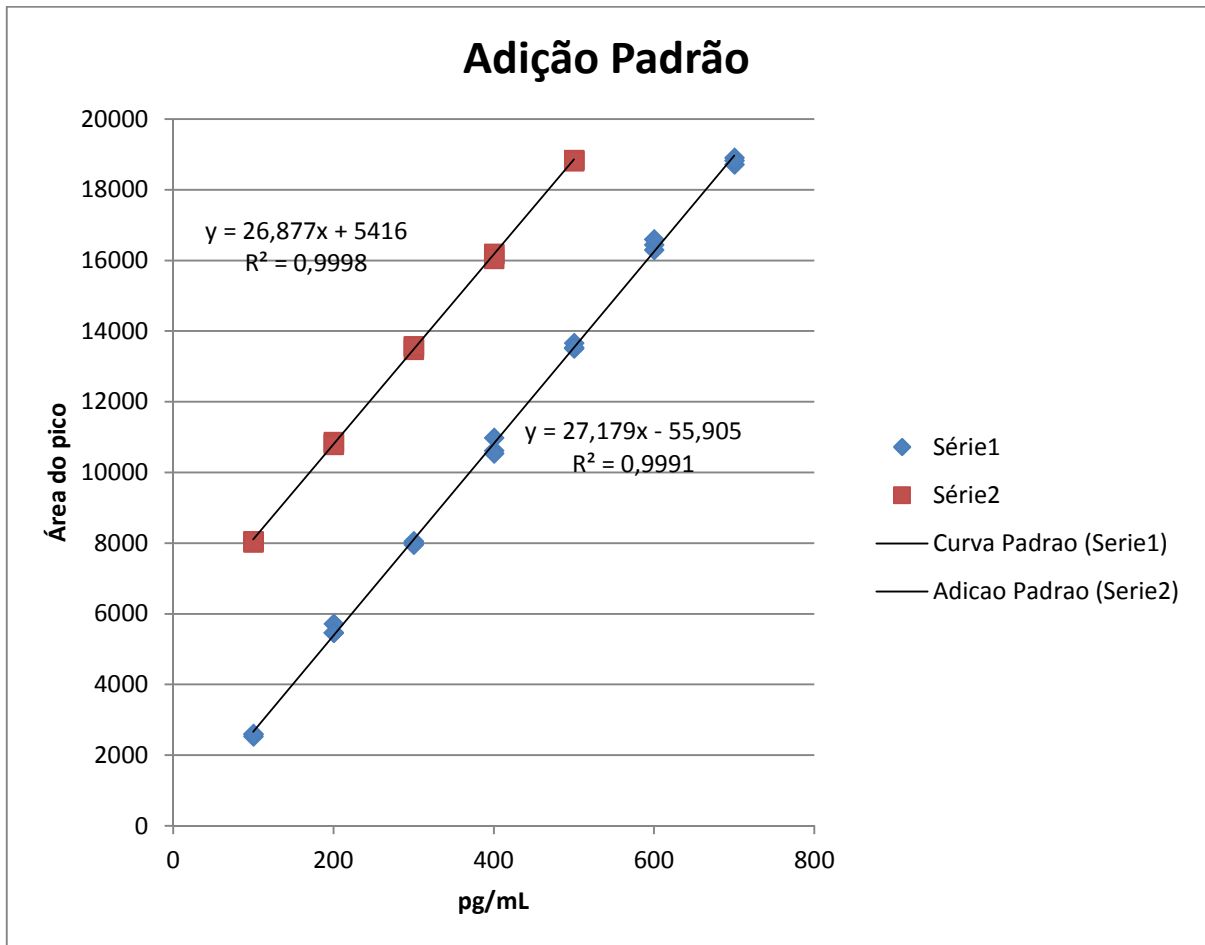
Como demonstrado na figura 30, a intensidade do sinal na injeção da solução branco foi de aproximadamente 390, tendo sido, frente ao sinal do EDAC, considerado ruído da linha de base. A figura 31 mostra o comparativo entre a solução branco e a solução branco contaminada com EDAC em que a intensidade do sinal do pico de EDAC é de $2,36 \times 10^5$, sugerindo que não há sinal de interferência significativa da matriz no sinal de EDAC.

Figura 31 - Comparação entre solução branco e solução branco contaminada com EDAC



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 realizadas com o EDAC utilizado como padrão para a construção da curva de calibração. Foi construída uma curva de calibração e uma curva de adição padrão de EDAC (figura 32) para verificar a possibilidade de interferência da matriz.

Figura 32 - Curva de adição padrão para avaliar a interferência de matriz



A figura 32 também sugere que não houve interferência significativa da matriz através do paralelismo entre as curvas, pois a razão percentual entre os coeficientes angulares calculada foi próxima de 1%. Quando ocorre o caso de interferência de matriz na análise, as curvas se interceptarão e os coeficientes angulares das mesmas apresentarão valores bem distintos, obtendo-se uma razão percentual elevada entre eles.

Para confirmação da inexistência de interferência da matriz sobre o sinal do EDAC, utilizando adição padrão, foram realizadas mais três curvas de adição padrão e três curvas de calibração e extraiu-se os coeficientes angulares das mesmas para execução de teste estatístico. A tabela 5 apresenta o resultado do teste-t realizado nos coeficientes angulares das curvas de adição padrão e curvas de calibração.

Tabela 5 - Teste-t entre os grupos de coeficientes angulares das curvas de adição padrão e curva de calibração para avaliar a interferência da matriz

Teste-t: duas amostras em par para médias		
	<i>Curva Adição Padrão</i>	<i>Curva de Calibração</i>
Média	26,25	26,99
Variância	0,4009	0,0373
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0,8689	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-2,698	
P(T<=t) uni-caudal	0,0572	
t crítico uni-caudal	2,920	
P(T<=t) bi-caudal	0,1143	
t crítico bi-caudal	4,303	

Desta forma, a avaliação dos resultados permitiu concluir que, dentro do nível de significância de 95% adotado para o teste, não foi possível observar diferença estatística entre as medias obtidas, onde o valor de t calculado é menor que o valor de t tabelado, aprovando a hipótese nula para os coeficientes angulares das curvas de adição padrão e calibração.

Para melhor assegurar a inexistência de interferência de matriz, foram obtidos três espectros de massas (*MS Scan*), sendo eles: o espectro de massas da solução padrão de EDAC a 4 µg/mL (figura 33), o espectro de massas da solução branco (PMT + PRRP) (figura 34) e o espectro de massas da solução branco contaminada com EDAC a 2µg/mL (figura 35).

Figura 33 - Espectro de massas da solução padrão de EDAC a 4 µg/mL

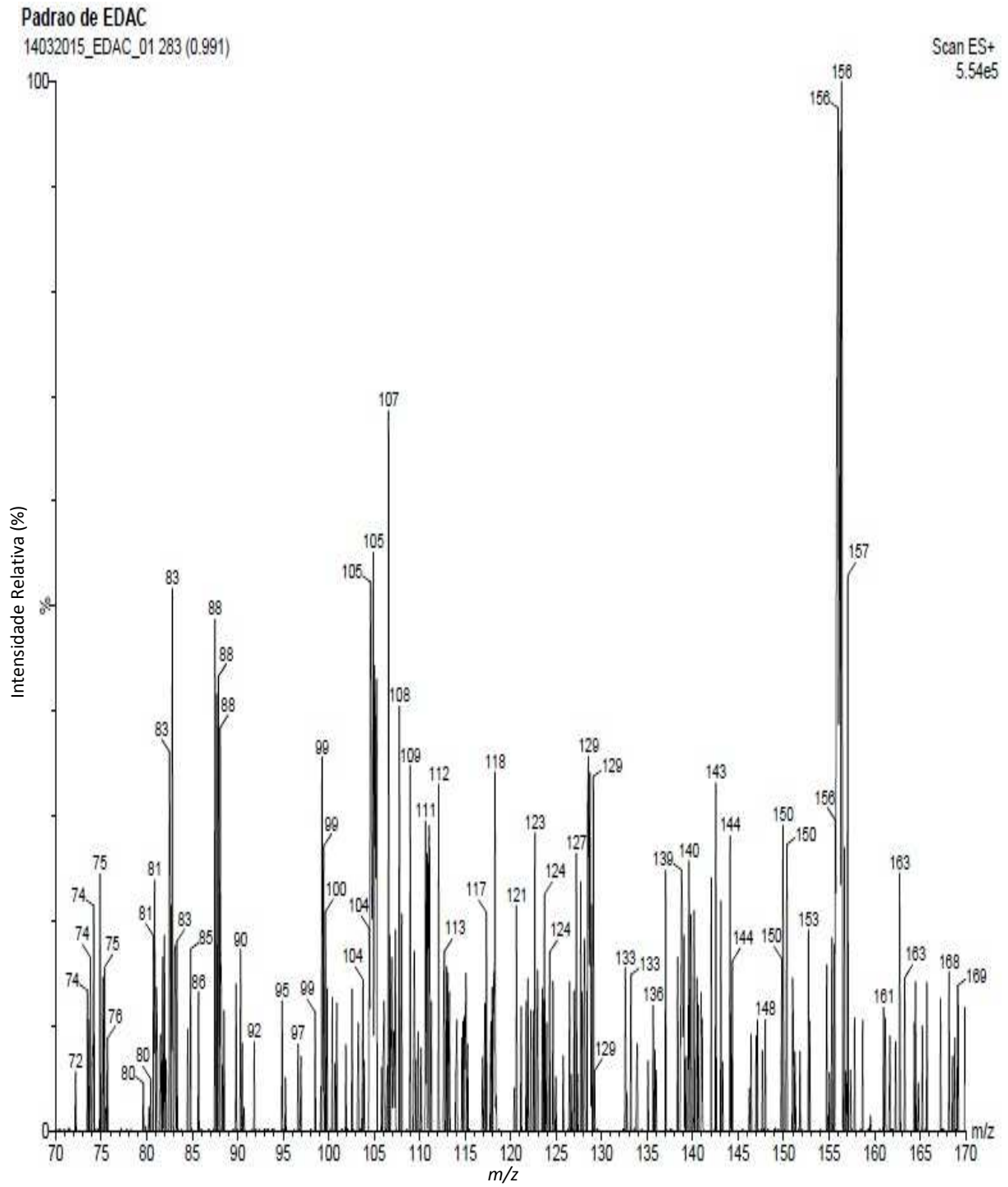


Figura 34 - Espectro de massas da solução branco (PMT + PRRP)

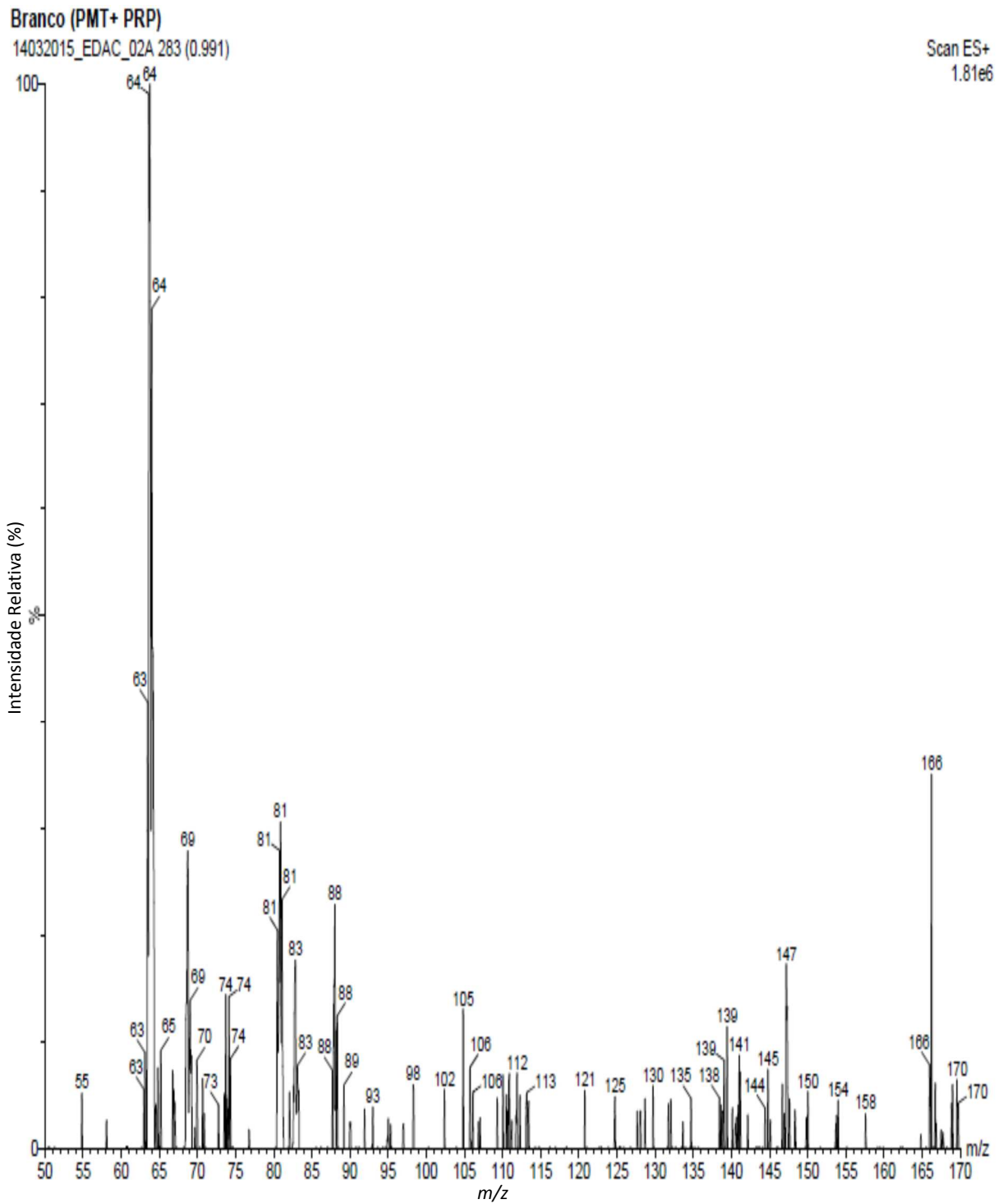
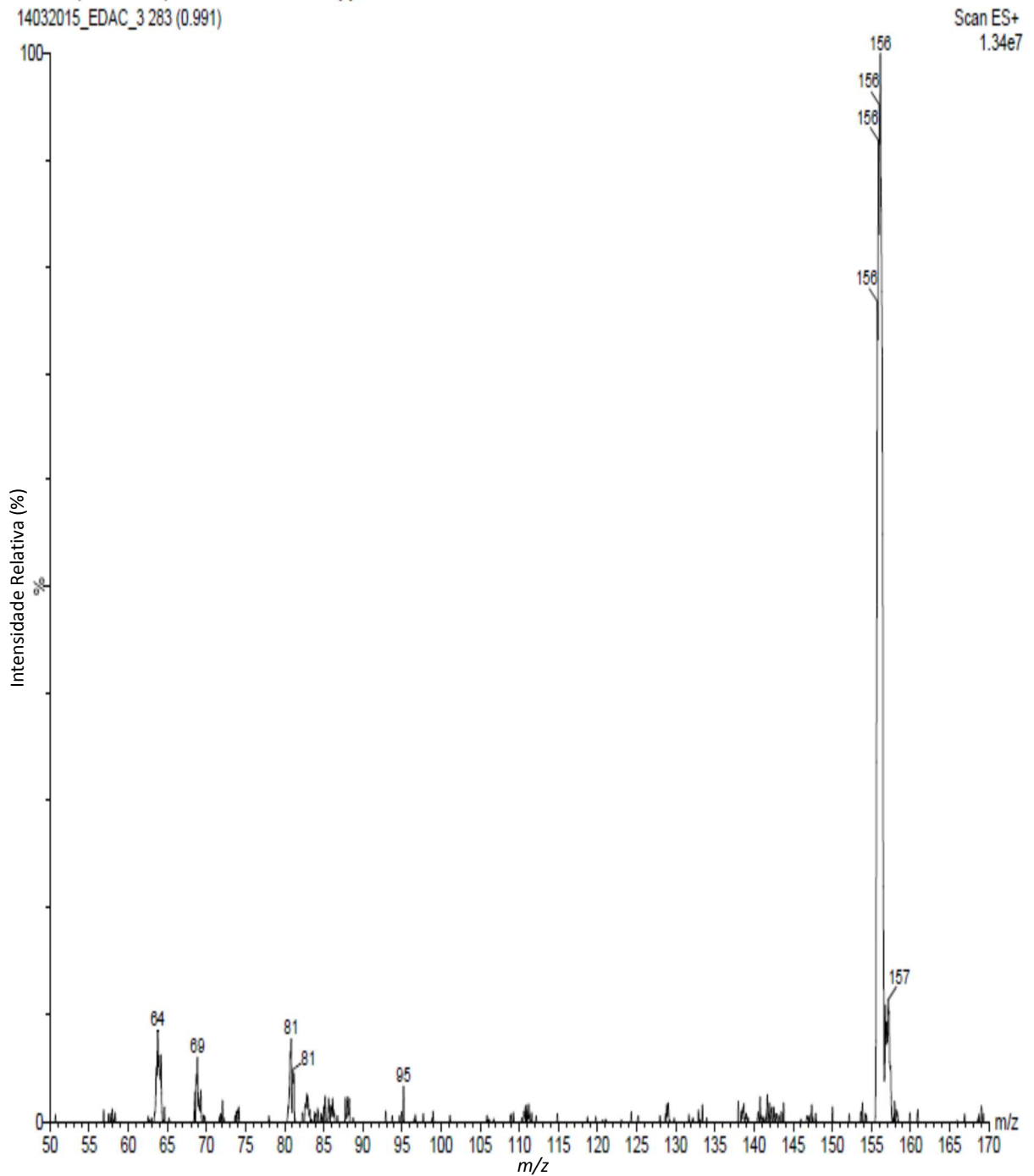


Figura 35 - Espectro de massas da solução branco contaminada com EDAC a 2µg/mL

Branco (PMT+ PRP) - contaminado com 2ppm de EDAC
14032015_EDAC_3.283 (0.991)



Nos espectros de massas do padrão de EDAC (figura 33) e no da solução branco contaminada com EDAC (figura 35), foi identificado o íon m/z 156 referente à molécula protonada do EDAC em modo positivo. Já no espectro de massas da solução branco não contaminada (figura 34) o íon m/z 156 não foi visualizado. Esse resultado está em

conformidade com os anteriores e permite sugerir que não há uma interferência da matriz considerada significativa.

4.2.2. Linearidade

Em primeiro lugar, a linearidade do método foi avaliada através dos valores do coeficiente de correlação (r) de cada uma das três curvas de calibração, preparadas independentemente, com três replicatas de cada um dos sete níveis de concentração (figuras 36, 37 e 38).

Figura 36 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva A

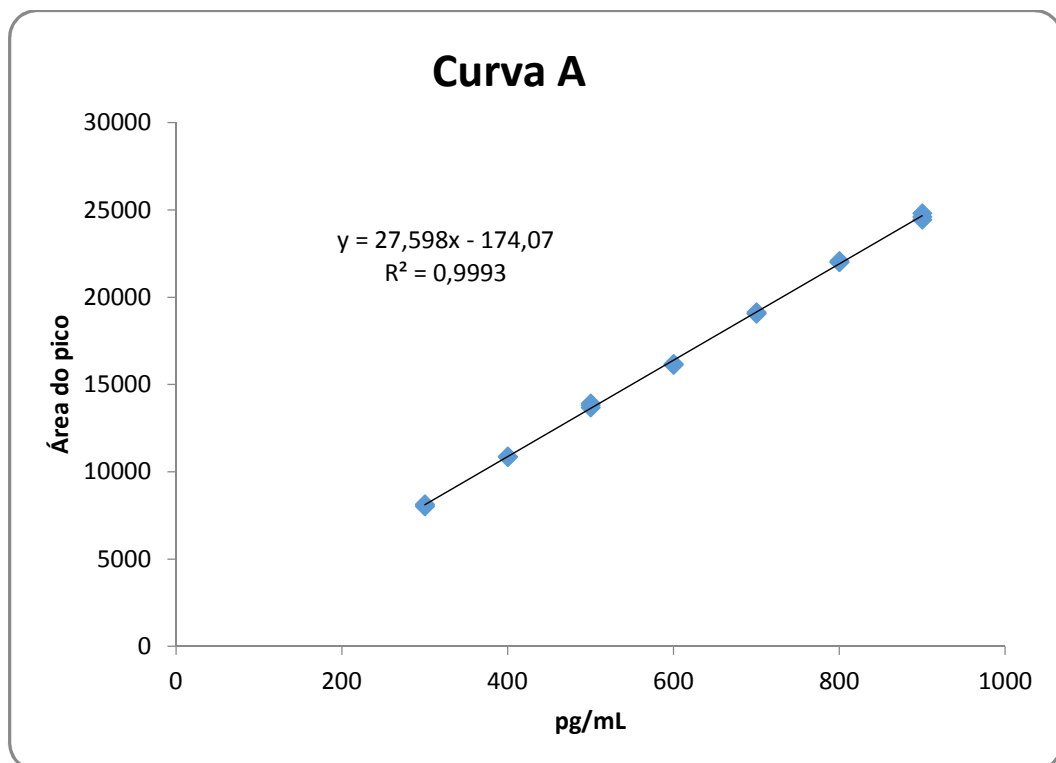
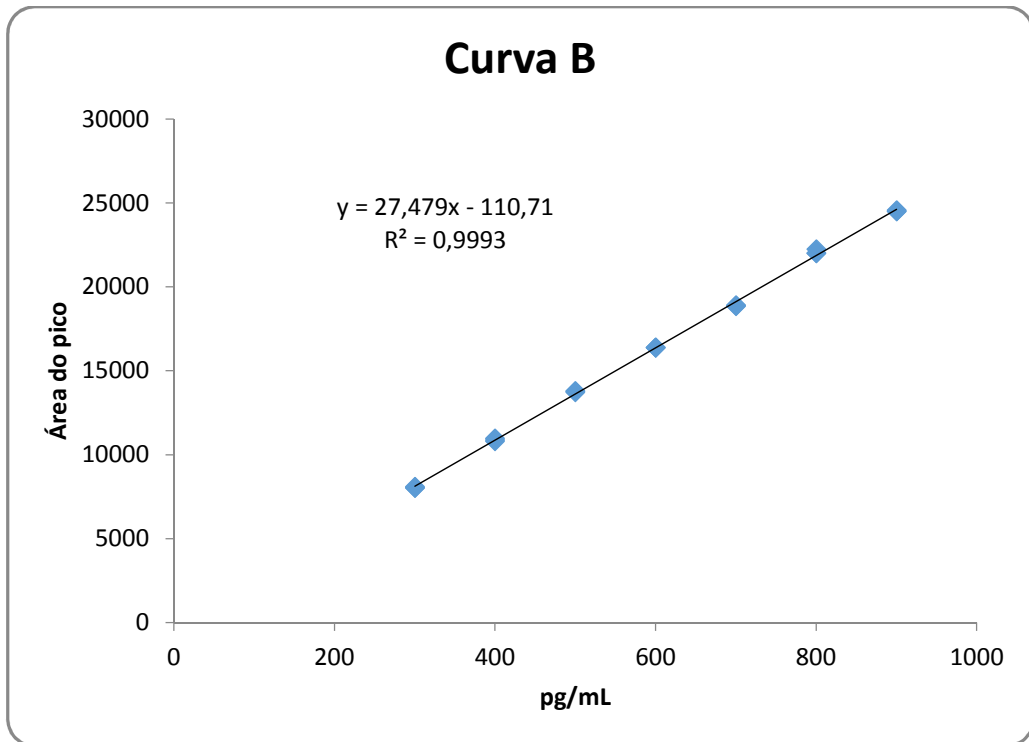
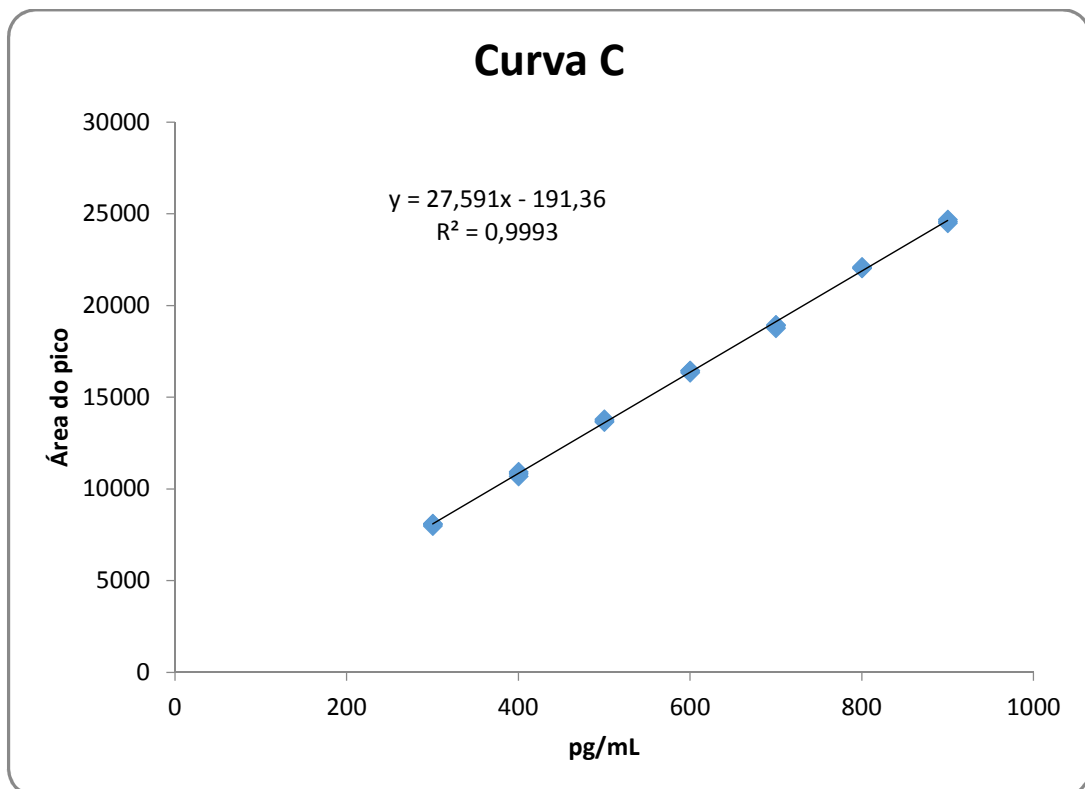


Figura 37 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva B**Figura 38 - Curva de calibração obtida para avaliação da linearidade do método – Curva C**

O guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Anvisa (BRASIL, 2003) determina que a curva de calibração 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 de calibração 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 de calibração 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 não houve a necessidade de retirar nenhum valor. A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner, onde se obteve $R_{eq}(0,99) > R_{crit}(0,95)$. 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 $t_{calculado}(5,88 \times 10^{-1})$ inferior ao $t_{tabelado}(2,09)$. A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson, onde $d_{calculado}(2,40) > d_U$ (limite superior 1,42). A análise de variância (ANOVA) permitiu concluir que houve significância da regressão, pela obtenção de $p < 0,001(1,58 \times 10^{-25})$, 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 de calibração encontra-se em planilha adaptada de Souza e Junqueira (2005) no Anexo.

4.2.3. 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 de calibração. Seus valores foram determinados através da planilha de avaliação de linearidade de

curva de calibração elaborada por Souza e Junqueira (2005) (ANEXO). Os limites verificados para o método foram, respectivamente, 29,0 pg/mL e 86,2 pg/mL.

4.2.4. 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 5, foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

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

Onde C1 corresponde à concentração do analito na amostra fortificada, C2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e C3 equivale à concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Tabela 6 - Resultado do ensaio de recuperação realizado na amostra de PSTT

Concentração do padrão adicionado (pg/mL)	Concentração Teórica (pg/mL)	Concentração encontrada (pg/mL)	Recuperação (%)
100,00	398,19	400,87	102,67
200,00	498,19	500,44	101,12
300,00	598,19	596,11	99,30
400,00	698,19	695,17	99,25

A recuperação média obtida foi de 100,59%. Segundo BRITO *et al* (2003), existem valores críticos aceitáveis para cada nível de concentração do analito em estudo e esses são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários tendem a apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Em função da faixa de concentração desse estudo que é de pg/mL o intervalo de recuperação aceito, segundo BRITO *et al* (2003), é de 40 a 120%. Isso demonstra que o método desenvolvido é apropriado para a determinação do EDAC em PSTT.

4.2.5. 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: Temperatura de trabalho e pH da fase móvel. O intuito de verificar cada um destes fatores foi comprovar se pequenas alterações no procedimento podem, ou não, afetar o desempenho do método.

Para a avaliação da robustez pela temperatura da coluna cromatográfica foi modificada a temperatura em dois estágios e depois os resultados obtidos foram comparados com aquele submetido à condição de temperatura convencional inicialmente. As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados do teste-F seguido pelo respectivo teste t nas amostras testadas nas temperaturas de 30 e 25°C e as tabelas 9 e 10 apresentam os resultados do teste-F seguido pelo respectivo teste t nas amostras testadas nas temperaturas de 30 e 35°C

Tabela 7 - Teste F para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 25°C.

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Temp. 30°C</i>	<i>Temp. 25°C</i>
Média	593,62	682,08
Variância	47,082	39,027
Observações	6	6
gl	5	5
F	1,2064	
P(F<=f) uni-caudal	0,42095	
F crítico uni-caudal	5,0503	

Tabela 8 - Teste t para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 25°C.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Temp. 25°C</i>	<i>Temp. 30°C</i>
Média	682,08	593,62
Variância	39,027	47,082
Observações	6	6
Variância agrupada	43,055	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	23,350	
P(T<=t) uni-caudal	2,3493E-10	
t crítico uni-caudal	1,8125	
P(T<=t) bi-caudal	4,6986E-10	
t crítico bi-caudal	2,2281	

Desta forma, a avaliação dos resultados para essa mudança de temperatura de 30 para 25°C, permitiu concluir que, dentro do nível e significância de 95% adotado para o teste, foi possível observar diferença estatística entre as médias obtidas na amostra, onde o valor de t calculado está acima do valor tabelado rejeitando-se assim a hipótese nula, para as duas diferentes temperaturas testadas.

Tabela 9 - Teste F para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 35°C.

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Temp. 30°C</i>	<i>Temp. 35°C</i>
Média	593,62	467,60
Variância	47,082	23,638
Observações	6	6
gl	5	5
F	1,9918	
P(F<=f) uni-caudal	0,23381	
F crítico uni-caudal	5,0503	

Tabela 10 - Teste t para avaliação da robustez da variação na temperatura da coluna - 30°C para 35°C.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>Temp. 30°C</i>	<i>Temp. 35°C</i>
Média	593,62	467,60
Variância	47,082	23,638
Observações	6	6
Variância agrupada	35,360	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	36,708	
P(T<=t) uni-caudal	2,6778E-12	
t crítico uni-caudal	1,8125	
P(T<=t) bi-caudal	5,3556E-12	
t crítico bi-caudal	2,2281	

A avaliação dos resultados para essa mudança de temperatura de 30 para 35°C permitiu concluir que, dentro do nível e significância de 95% adotado para o teste, foi possível observar diferença estatística entre as médias obtidas na amostra, onde o valor de t calculado está acima do valor tabelado rejeitando-se assim a hipótese nula, para as duas diferentes temperaturas testadas.

Outra proposta de avaliação testada considerou a modificação do pH da fase móvel a fim de se observar sua influência nos resultados obtidos. Neste sentido, modificou-se o pH em dois estágios diferentes, de 10,0 para 9,5 e de 10,0 para 10,5.

Os resultados foram avaliados através do teste-F e do teste t, a exemplo do que vem sendo seguido até então. Os dados estatísticos da modificação do pH de 10,0 para 9,5 encontram-se nas tabelas 11 e 12 e os da modificação de 10,0 para 10,5 nas tabelas 13 e 14.

Tabela 11 - Teste F para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 9,5.

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>pH10.0</i>	<i>pH9.5</i>
Média	593,62	690,88
Variância	47,082	27,967
Observações	6	6
gl	5	5
F	1,6835	
P(F<=f) uni-caudal	0,29074	
F crítico uni-caudal	5,0503	

Tabela 12 - Teste t para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 9,5.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>pH9.5</i>	<i>pH10.0</i>
Média	690,88	593,62
Variância	27,967	47,082
Observações	6	6
Variância agrupada	37,525	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	27,499	
P(T<=t) uni-caudal	4,6848E-11	
t crítico uni-caudal	1,8125	
P(T<=t) bi-caudal	9,3697E-11	
t crítico bi-caudal	2,2281	

Como foi possível observar nos dados acima, o valor de t calculado está acima do valor tabelado, desta forma, rejeita-se a hipótese nula, e é possível concluir que há diferença estatística entre as médias obtidas quando se modifica o valor do pH de 10,0 para 9,5.

Tabela 13 - Teste F para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 10,5.

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>pH10.5</i>	<i>pH10.0</i>
Média	593,17	593,62
Variância	143,43	47,082
Observações	6	6
gl	5	5
F	3,0464	
P(F<=f) uni-caudal	0,12344	
F crítico uni-caudal	5,0503	

Tabela 14 - Teste t para avaliação da robustez da variação do pH da fase móvel - pH 10,0 para 10,5.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	<i>pH10.0</i>	<i>pH10.5</i>
Média	593,62	593,17
Variância	47,082	143,43
Observações	6	6
Variância agrupada	95,257	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	0,08045	
P(T<=t) uni-caudal	0,46873	
t crítico uni-caudal	1,8125	
P(T<=t) bi-caudal	0,93747	
t crítico bi-caudal	2,2281	

Como foi possível observar nos dados das tabelas 13 e 14, o valor de t calculado está abaixo do valor tabelado, desta forma, a hipótese nula é aprovada e, dentro do nível de significância de 95% adotado para o teste, não foi possível observar diferença estatística entre as medias obtidas quando se modifica o valor do pH de 10,0 para 10,5.

5. CONCLUSÕES

A metodologia praticada pelo LAFIQ de Bio-Manguinhos é a técnica de ensaio limite que não possibilita a quantificação do EDAC no PSTT, sem contar com o maior tempo de análise havendo risco da degradação do padrão, já que o mesmo é preparado em água, e a maior geração de resíduos devido ao maior fluxo de fase móvel utilizado (1 mL/min).

A metodologia desenvolvida nesse estudo se mostrou adequada para determinação de EDAC nas amostras de PSTT, além de atender às necessidades do laboratório de redução de tempo de análise, de consumo de solventes e de geração de resíduos.

A nova metodologia possibilitou uma redução no tempo de análise em relação à anterior. O fluxo de fase móvel foi reduzido 66,6% (0,3 mL/min) gerando assim uma menor quantidade de resíduos. O estudo de estabilidade do EDAC permitiu um prazo maior de manipulação da solução padrão e a técnica de espectrometria de massas possibilitou a quantificação de EDAC no PSTT.

Os parâmetros de adequação do sistema da nova metodologia ficaram em conformidade com o que é preconizado nos compêndios oficiais. O método demonstrou seletividade apreciável, 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.

A recuperação média obtida demonstrou que o método apresenta exatidão adequada. Em relação à robustez foi constatada a susceptibilidade do método a variações de temperatura e na alteração do pH da fase móvel para 9,5. Na alteração do pH da fase móvel para 10,5 não foi possível observar diferença estatística significativa.

A análise das figuras analíticas de mérito do método produziu dados adequados para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos obtidos e para também garantir uma futura validação do método e posteriormente o emprego da metodologia proposta no controle de qualidade do PSTT, 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).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Antonio Eugenio Castro Cardoso et al. **Cepas de Haemophilus influenzae circulantes, antes e após a utilização da vacina contra o sorotipo b, e o contexto epidemiológico das doenças por Haemophilus no Brasil**. 2005. Tese de Doutorado.
- BOUSKELA, Maria Angela Loguercio; GRISI, Sandra; ESCOBAR, Ana Maria de Ulhôa. Aspectos epidemiológicos da infecção por Haemophilus influenzae tipo b. **Rev Panam Salud Publica**, v. 7, n. 5, p. 333, 2000.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.[online] [consultado em 24 nov 2014]. **Disponível em:** http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
- BRITO, NATILENE MESQUITA *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.
- BUSTILLOS, Jose Oscar Willian Vega; SASSINE, André; MARCH, Raymond. **A espectrometria de massas quadrupolar**. Scortecci, 2003.
- CARDOSO, M. H. W. M. et al. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. Supl 1, p. 63-72, 2010.
- CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- COCHI, Stephen L.; BROOME, Claire V.; HIGHTOWER, Allen W. Immunization of US children with Hemophilus influenzae type b polysaccharide vaccine: a cost-effectiveness model of strategy assessment. **Jama**, v. 253, n. 4, p. 521-529, 1985.
- SOUZA, Scheilla VC de; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1, p. 25-35, 2005.
- FITZWATER, Sean P. et al. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines: considerations for vaccination schedules and implications for developing countries. **Human vaccines**, v. 6, n. 10, p. 810-818, 2010.

FOTHERGILL, LeRoy D.; WRIGHT, Joyce. Influenzal meningitis the relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. **The Journal of Immunology**, v. 24, n. 4, p. 273-284, 1933.

GIL, E. de S. et al. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. **São Paulo: Pharmabooks**, v. 46, p. 103-104, 2007.

GOLDBLATT, D. Conjugate vaccines. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 119, n. 1, p. 1-3, 2000.

GOYAL, Navneet. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)Carbodiimide Hydrochloride (EDCIx HCl). **Synlett**, v. 2010, n. 02, p. 335-336, 2010.

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

JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 2, p. 293-324, 2005.

KNISKERN, P. J.; MARBURG, S. Development and Clinical Uses of Haemophilus b Conjugate Vaccines: Conjugation: Design, Chemistry, and Analysis Ellis, RW, and Granoff, DM, Eds. 1994.

KUHNERT, Peter; CHRISTENSEN, Henrik (Ed.). **Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects**. Horizon Scientific Press, 2008.

LANÇAS, Fernando M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis". **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LORTHIOIS, Ana Paula de Almeida Aranha. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b com toxóide tetânico**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MALDANER, Liane; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

NASCIMENTO-CARVALHO, Cristiana M.; ANDRADE, Ana Lúcia S. Vacinação contra Haemophilus influenzae tipo b: proteção a longo prazo. **J. pediatr. (Rio J.)**, v. 82, n. 3, supl, p. s109-s114, 2006.

OLIVEIRA, Adriana Corrêa Pereira. Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Bioanalítica Para Quantificação de Zolpidem em Plasma Humano Utilizando a Técnica de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). **Universidade São Francisco**, 2010.

PELTOLA, Heikki. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 2, p. 302-317, 2000.

PEREIRA, Alberto dos Santos et al. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. S107-S111, 2005.

PITTMAN, Margaret. Variation and type specificity in the bacterial species Hemophilus influenzae. **The Journal of experimental medicine**, v. 53, n. 4, p. 471-492, 1931.

PONTE, C. F.: Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências, Saúde**. Manguinhos, vol. 10 (suplemento 2): 619-53, 2003.

QUEIROZ, Sonia CN; FERRACINI, Vera L.; ROSA, Maria A. Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.



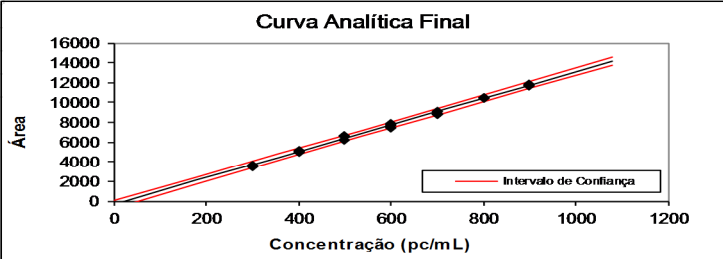
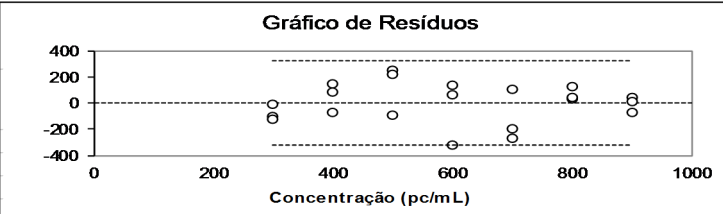
RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

USP XXXVII, The United States Pharmacopeia, 37^oed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

WENGER, Jay D. et al. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. **Journal of infectious diseases**, v. 162, n. 6, p. 1316-1323, 1990.

ANEXO

Tabela 15 - Tabela da avaliação de linearidade de curva de calibração (SOUZA E JUNQUEIRA, 2005 com adaptações)

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA					
Dados da Curva Analítica					
Análise:	Determinação de EDAC				
Data de Confeção da Curva:	09/04/2015	Curva Nº:	1		
Replicatas por Nível (k):	3	Nº de Níveis (n):	7		
Equipamento:	UPLC-MS/MS Acquity W	Responsável:	Leonardo		
Tabela de dados originais					
Nível (k)	i	Conc. pc/mL	Resposta Área		
1	01	300,000	3572		
	02	300,000	3551		
	03	300,000	3666		
2	04	400,000	5163		
	05	400,000	4945		
	06	400,000	5101		
3	07	500,000	6610		
	08	500,000	6267		
	09	500,000	6583		
4	10	600,000	7389		
	11	600,000	7768		
	12	600,000	7845		
5	13	700,000	8859		
	14	700,000	8788		
	15	700,000	9157		
6	16	800,000	10525		
	17	800,000	10434		
	18	800,000	10445		
7	19	900,000	11785		
	20	900,000	11667		
	21	900,000	11758		
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.					
Curva Analítica Final					
					
Gráfico de Resíduos					
					
Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,99				
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95				
Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	2,40				
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22				
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42				
Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	2,47E+04				
t_L calculado	5,88E-01				
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,09E+00				
p	5,64E-01				
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	$Req > Rcrit$				
Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)					
Coefficiente Angular (b):	1,35E+01	Coefficiente Linear (a):	-3,63E+02		
r	0,9985	R ²	0,9971		
N	21	Graus de Liberdade	19		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	2,90E+01	Limite de Quantificação	8,62E+01		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,52E+08	1,52E+08	6,46E+03	1,58E-25
resíduos	19	4,47E+05	2,35E+04		
Ajuste	5	1,33E+05	2,67E+04	1,19E+00	3,63E-01
erro puro	14	3,14E+05	2,24E+04		
total	20	1,52E+08			
Observações					
Responsável: _____ Data: ____/____/____ Verificado por: _____ Data: ____/____/____					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA			Pág.:1/1		