

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

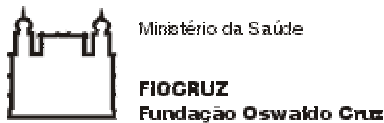
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS
MENINGOCÓCICOS SOROGRUPOS C E W135**

ANA PAULA FERNANDES LEAL

RIO DE JANEIRO

2013



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANA PAULA FERNANDES LEAL

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS MENINGOCÓCICOS SOROGRUPOS C E W135

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

**RIO DE JANEIRO
2013**

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

L435 Leal, Ana Paula Fernandes.

Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135./ Ana Paula Fernandes Leal.- Rio de Janeiro, 2013.

xxii, 122f.: il.; 30cm.

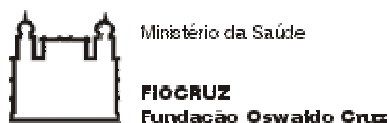
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2013

Bibliografia: f. 88-98

1. Polissacarídeo meningocócico sorogrupo C. 2. Polissacarídeo meningocócico sorogrupo W135. 3. RMNq. 4. Eletroforese Capilar. 5. Espectrofotometria UV-Vis. I.
Título

CDD 615.1901

Trabalho realizado no Laboratório Físico-Químico – Bio-Manguinhos e no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Ivna Alana F. B. da Silveira e da Prof^a. Dr^a. Érika Martins de Carvalho.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ANA PAULA FERNANDES LEAL

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS
MENINGOCÓCICOS SOROGRUPOS C E W135**

ORIENTADORES: Prof^ª Dr^ª Ivna Alana F. B. da Silveira
Prof^ª Dr^ª Érika Martins de Carvalho

Dissertação aprovada em 31 de maio de 2013

Examinadores:

Dr^ª Marilza Batista Corrêa
FIOCRUZ / Presidente

Dr^ª Rosane Aguiar da Silva San Gil
UFRJ

Dr José Daniel Figueroa-Villar
IME

Rio de Janeiro

2013

À minha família:
Rafa, João, Valentina, Malu, Edu e Edinho, meus portos seguros. Sem eles nada disso seria
possível!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que ilumina a minha vida e pela força que me faz ultrapassar muitas barreiras.

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

Ao Dr. Akira Homma, criador desta oportunidade de crescimento intelectual e profissional em Bio-Manguinhos.

À Darcy Akemi, Ana Lucia Palmigiani e Cristine Maria de Lima pela permissão e incentivo da realização do curso de mestrado em Bio-Manguinhos.

Às minhas queridas orientadoras, Dra. Erika Martins e Dra. Ivna Alana, pelo aceite em me orientarem e pelo carinho, amizade, paciência e grandes incentivos dispensados durante todos os momentos da realização desta dissertação.

À coordenação e secretaria do MPTI, Dra. Sheila Farage, José Antonio Pinto e Zaíra Prado, por toda atenção, preocupação e ajuda durante esse difícil período.

A todos os professores do MPTI, pelos valiosos conhecimentos ensinados que contribuíram muito em minha formação.

À Far-Manguinhos, pela liberação do uso dos equipamentos de RMN. Em especial ao técnico Charles Amaral, por me ajudar com todo o manuseio destes equipamentos.

À Maria Denise Neves e Milton Neto, pelas ideias valiosas e por estarem sempre dispostos a me ajudar com os “mistérios” da RMN.

À Camila Faia e Iaralice Souza, por toda a ajuda nos experimentos de eletroforese capilar.

Ao Paulo Dick, pela ajuda com os cálculos estatísticos.

Aos meus pais, Eduardo Leal e Maria da Luz Leal, meus exemplos de vida, por sempre me encorajarem nas horas difíceis e me aplaudirem em meus momentos de glória.

Aos homens da minha vida, Rafael Bocos e João Pedro Leal por torcerem por mim a todo o momento.

Ao meu irmão Edison Leal, por todo apoio, ajuda e carinho fornecido.

À minha pequena Valentina, a qual estou doida para ver seu rostinho, por estar me fazendo suportar cada momento de nervosismo no final dessa caminhada. A cada momento de desânimo é ela que me dá um “chutinho” para continuar adiante!

À minha companheira de estudo, Anelyse Lira, pelo aprendizado e guloseimas compartilhadas.

A todos os colegas de turma do MPTI, por terem me proporcionado momentos inesquecíveis, fossem alegres ou difíceis, mas que, sem dúvida tornaram essa caminhada mais feliz.

À Jéssica Yukie, por participar com entusiasmos dos ensaios de pré-validação e por me incentivar a todo momento.

À Carina Cantelli, Andrea Barros e Claudia Amorim por me apoiarem e me darem força na realização deste trabalho.

Aos meus queridos companheiros do LAFIQ, pelas prazerosas horas de trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente contribuiriam para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

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

(Martin Luther King)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xvi
LISTA DAS FIGURAS.....	xviii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- A doença meningocócica.....	1
1.2- Agente etiológico.....	2
1.3- Aspectos epidemiológicos da doença.....	4
1.4- Vacinas meningocócicas.....	7
1.5- Polissacarídeos meningocócicos.....	10
1.6- Controle de Qualidade de vacinas meningocócicas.....	12
1.7- Eletroforese Capilar (EC).....	14
1.8- Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	15
1.8.1- Princípios da Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq).....	17
1.8.1.1- Métodos para os cálculos quantitativos.....	30
1.8.1.2- Exemplos da utilização da RMNq nas vacinas meningocócicas.....	33
1.9- Validação de métodos analíticos.....	34
1.10- Justificativa do trabalho.....	36
2- OBJETIVOS.....	37
2.1- Geral.....	37
2.2- Específicos.....	37
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1- Experimentos por RMN de ¹ H.....	39
3.1.1- Preparo das amostras e padrões.....	39
3.1.2- Condições experimentais.....	39
3.1.3- Processamento dos dados.....	40
3.2- Experimentos por espectrofotometria UV-Vis.....	44
3.3- Experimentos por EC.....	44
3.3.1- Preparo das amostras, padrões e curva de calibração.....	44
3.3.2- Condições experimentais.....	45
3.3.3- Processamento dos dados.....	46
3.4- Estudo de pré-validação do método de RMNq.....	46
3.5- Avaliação e comparação estatística dos métodos UV-Vis, RMNq e EC.....	47
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
4.1- Identidade dos polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135 por RMN de ¹ H.....	48

4.1.1- PSC.....	48
4.1.2- PSW135.....	51
4.2- Otimização dos parâmetros de aquisição para os espectros quantitativos de RMN de ¹ H.....	56
4.2.1- Tempo de espera - <i>Delay</i> (<i>d</i> ₁).....	56
4.2.2- Número de varreduras – número de <i>scans</i> (ns).....	57
4.2.3- Temperatura (T).....	58
4.2.4- Janela espectral (<i>SW</i>).....	59
4.3- Avaliação dos resultados obtidos por RMNq.....	60
4.4- Avaliação dos resultados obtidos por EC.....	68
4.5- Avaliação do estudo de pré-validação do método de RMNq de ¹ H para o PSW135.....	72
4.5.1- Especificidade/Seletividade.....	72
4.5.2- Linearidade.....	75
4.5.3- Precisão.....	77
4.5.3.1- Repetitividade.....	77
4.5.3.2- Precisão Intermediária.....	78
4.5.4- Exatidão.....	78
4.5.5- Intervalo.....	80
4.5.6- Robustez.....	80
4.6- Comparação estatística dos métodos RMNq, UV-Vis e EC.....	82
5- CONCLUSÕES.....	87
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
δ	Deslocamento químico
μmol	Micromol
1D	Unidimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQ	Tempo de aquisição
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
CEC	Eletrocromatografia capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Focalização isoeletrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CLAE	Cromatografia de Alta Performance
cm	Centímetro
CSA	Agentes orgânicos de solvatação quirais
CV	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona
d	Dupleto
d_1	<i>delay</i> (Tempo de espera entre as aquisições)
dd	Duplo-dupleto
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
DM	Doença meningocócica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSY	<i>Diffusion-ordered spectroscopy</i>

DSS	Dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio
DW	Tempo de permanência
EC	Eletroforese Capilar
FID	<i>Free induction decay</i> (Decaimento livre de indução)
g	Grama
GARP	<i>Globally Optimized Alternating-Phase Rectangular Pulses</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HOD	Sinal da água
HPSEC	<i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia de Alta Performance por Exclusão de Tamanho Molecular)
Hz	Hertz
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
I.R.	Inversão-recuperação
IT	Instrução de trabalho
K	Kelvin
Kd	Constante de distribuição
K _{aq}	Constante do espectrofotômetro que engloba os parâmetros de aquisição
KV	Kilovolts
L	Litro
LAFIQ	Laboratório Físico-Químico
lb	Largura da linha
LCR	Líquido encefalorraquidiano
LSR	Reagentes de deslocamento lantanídeo
M	Molar
m	Multiplete
mbar	Milibar
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
mg	Miligrama
MHz	MegaHertz
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm	Milímetro
mmol	Milimol
ms	Microsegundos
<i>n</i>	Número de amostra
NAc	<i>N</i> -acetil
NANA	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
nm	Nanômetro
ns	Número de <i>scans</i>
OAc	<i>O</i> -acetil
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
ppm	parte por milhão
PSA	Polissacarídeo Meningocócico sorogrupo A
PSC	Polissacarídeo Meningocócico sorogrupo C
PSX	Polissacarídeo Meningocócico sorogrupo X
PSW135	Polissacarídeo Meningocócico sorogrupo W135
q	Quarteto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN _q	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
RG	Amplificação do sinal de RMN – notação da Bruker
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
s	Simpleto*
seg	Segundos*
S/R	Razão sinal/ruído
SW	Janela espectral do experimento por RMN
T	Temperatura
t	Tripleto
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
TD	Número de pontos

TF	Transformada de Fourier
TSP- d_4	Trimetilsilil propionato de sódio
UV	Radiação na região Ultravioleta
Vis	Radiação na região Visível
VVC	Valor verdadeiro convencional
WHO	World Health Organization

*neste trabalho, a sigla seg foi utilizada para representar segundos, já que “s” está representando simpleto.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1.1 – Principais agentes etiológicos causadores de meningite (Ministério da Saúde, 2009).....	1
Quadro 1.2 - Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos sorogrupos mais freqüentemente associados à doença meningocócica. (Bastos, 2005).....	11
Quadro 1.3 - Solventes utilizados na RMN (Holzgrabe, 2010).....	27
Quadro 1.4 – Lista de padrões de referência para qRMN de ¹ H (Malz, 2008).....	33
Tabela 3.1 - Valores de integral utilizados no cálculo de percentual de pureza e teor de OAc do PSC....	42
Tabela 3.2 - Valores de integral utilizados no cálculo de percentual de pureza do PSW135.....	43
Tabela 3.3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico (ANVISA, 2003).....	46
Tabela 4.1 - Deslocamento químico dos hidrogênios do padrão de NANA em D ₂ O.....	50
Tabela 4.2 - Deslocamento químico dos hidrogênios do PSC em D ₂ O.....	51
Tabela 4.3 - Deslocamento químico dos hidrogênios do padrão de galactose em D ₂ O.....	52
Tabela 4.4 - Deslocamento químico dos hidrogênios do PSW135 em D ₂ O.....	55
Tabela 4.5 - Valores de T ₁ dos hidrogênios presentes na amostra de PSC.....	56
Tabela 4.6 - Valores de T ₁ dos hidrogênios presentes na amostra de PSW135.....	57
Tabela 4.7 - Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ¹ H do PSC, calculada em função da variação do número de <i>scans</i>	58
Tabela 4.8 - Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ¹ H do PSW135, calculada em função da variação do número de <i>scans</i>	58
Tabela 4.9 - Valores da razão S/N, para os espectros de RMN de ¹ H do PSC, calculada em função da variação da temperatura.....	59
Tabela 4.10 - Valores da razão S/N, para os espectros de RMN de ¹ H do PSW135, calculada em função da variação da temperatura.....	59
Tabela 4.11 - Parâmetros de RMN utilizados na obtenção de espectros quantitativos de PSC e PSW135.....	60
Tabela 4.12 - Percentual de pureza e conteúdo de grupos OAc presentes nos lotes de PSC, determinados por RMNq utilizando uma sequência padrão de hidrogênio.....	61
Tabela 4.13 - Percentual de pureza e conteúdo de grupos OAc presentes nos lotes de PSC, determinados por RMNq utilizando uma sequência GARP.....	62
Tabela 4.14 - Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por RMNq utilizando uma sequência padrão de hidrogênio.....	64
Tabela 4.15 - Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por RMNq através de uma sequência padrão de hidrogênio e de uma sequência GARP, utilizando o sinal do H-3 _{eq} para os cálculos.....	66
Tabela 4.16 - Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por EC utilizando a área normalizada.....	71
Tabela 4.17 - Resultados de linearidade da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135.....	75
Tabela 4.18 - Avaliação do ajuste da curva padrão de NANA do método de RMNq para quantificação do PSW135.....	76
Tabela 4.19 - Resultados de repetitividade da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.....	77
Tabela 4.20 - Resultados de precisão intermediária da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.....	78
Tabela 4.21 - Resultados de exatidão da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, considerando a concentração da solução.....	79

Tabela 4.22- Resultados de exatidão da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, considerando o percentual de pureza do NANA em cada solução.....	79
Tabela 4.23- Resultados de obtidos pela variação da temperatura de aquisição dos espectros de RMNq de ¹ H para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.....	80
Tabela 4.24- Resultados de obtidos pela variação do número de varredura da aquisição dos espectros de RMNq de ¹ H para quantificação do PSW135.....	81
Tabela 4.25- Resultados de PSC obtidos por RMN e UV-Vis.....	82
Tabela 4.26- Resultados de PSW135 obtidos por RMN, UV-Vis e EC.....	84
Tabela 4.27 – Comparação entre os métodos de RMNq, EC e UV-Vis.....	86

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura da <i>N. meningitidis</i> (Sciencephoto Library, 2012).....	3
Figura 1.2 – Constituição do envelope celular da <i>N. meningitidis</i> com seus principais antígenos de superfície (Rosenstein et al., 2001).....	4
Figura 1.3 – Proporção da doença meningocócica por sorogrupo e por região, onde n = número de casos (Halperin et al., 2011).....	5
Figura 1.4 - Vacina contra meningite A e C – 10 doses, produzida por Bio-Manguinhos.....	9
Figura 1.5 – Estrutura química dos polissacarídeos meningocócicos (a) sorogrupo C e (b) sorogrupo W135 (Gudlavalleti et al., 2007; Broker et al., 2009).....	11
Figura 1.6 – Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O , com TSP- d_4 . O sinal referente ao TSP- d_4 (em 0,00ppm) é gerado por 9 núcleos, apresentando uma maior intensidade em relação ao sinal referente à metila do NAc (em 2,10ppm), que é gerado por 3 núcleos e ao sinal referente ao H-1' (5,10ppm), que é gerado pelo hidrogênio 1 do monômero galactose.....	18
Figura 1.7 – Espectro parcial de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm).....	19
Figura 1.8 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O . Presença de satélites de ^{13}C no sinal em 0ppm, referente ao padrão TSP- d_4	20
Figura 1.9 – Representação gráfica de um pulso de RMN de ^1H com esquema de desacoplamento de banda larga na região de ^{13}C para eliminar os satélites de ^{13}C de um espectro unidimensional de RMN de ^1H (Sequência GARP).....	20
Figura 1.10 – Espectros de RMN de ^1H , 500MHz do padrão NANA em D_2O . (a) espectro obtido utilizando sequência GARP; (b) espectro obtido utilizando sequência padrão de hidrogênio.....	21
Figura 1.11 - a) Perfil no domínio do tempo do pulso duro calibrado; b) perfil de excitação no domínio de frequência.....	22
Figura 1.12 - Definição do tempo de aquisição no domínio tempo e frequência.....	22
Figura 1.13 - Influência do tempo de aquisição na resolução digital no espectro.....	23
Figura 1.14 – a) Sequência de pulso para aquisição de RMN de ^1H ; b) Sequência inversão-recuperação para determinação dos valores de T_1	23
Figura 1.15 – A razão S/N aumenta com o aumento do número de <i>scans</i> (ns).....	24
Figura 1.16 – Uso da função de apodização para melhorar a razão sinal ruído.....	25
Figura 1.17 - Funções de apodização comumente empregadas.....	25
Figura 1.18 - (a) espectro com correção da linha de fase (espectro em fase); (b) espectro sem correção da linha de base (espectro de ordem zero).....	26
Figura 1.19 - Exemplos de problemas comuns de <i>Shimming</i> (TSP- d_4 em D_2O).....	26
Figura 1.20 – Espectros de RMN de H de ciprofloxacina em diferentes concentrações. (a) concentração da amostra = $2,6 \times 10^{-3}\text{M}$; (b) concentração da amostra = $109 \times 10^{-3}\text{M}$ e (c) concentração da amostra = $259 \times 10^{-3}\text{M}$ (Michaleas e Antoniadou Vyza, 2008).....	28
Figura 1.21 – Espectro de RMN de ^1H da heparina fracionada em D_2O (300MHz). O espectro em vermelho foi obtido numa temperatura de 353K e o espectro em azul a 300K. O sinal da HOD está apontando por um * (Beyer et al., 2008).....	29

Figura 1.22 - Espectros de RMN de ^1H de alanina, em D_2O , enriquecida com impurezas potenciais: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu) e ácido málico (MA). (a) dependente do pH, por meio da adição de NaOD. (b) com quantidades crescentes de impurezas (Holzgrabe, 2010).....	30
Figura 3.1 – Espectro de RMN de ^1H , 500MHz, do PSC em D_2O com os sinais de interesse para quantificação integrados.....	41
Figura 3.2 – Espectro de RMN de ^1H , 500MHz, do PSW135 em D_2O com os sinais de interesse para quantificação integrados.....	43
Figura 4.1 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de NANA em D_2O , com DSS (0,0ppm).....	49
Figura 4.2 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de NANA com ampliação dos seus sinais. (a) sinais referentes aos H-4, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9; (b) duplo-dupletto H-3 _{eq} ; (c) simpleto CH_3 do NAC; (d) tripleto H-3 _{ax}	49
Figura 4.3 – Espectro de RMN de ^1H 400MHz, representativo para ambos os lotes analisados de PSC em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm). Lote: IMC0011.....	50
Figura 4.4 – Espectro de RMN de ^1H 400MHz, do PSC em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) sinal referente aos H-7e H-8; (b) multipletto H-4, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9; (c) dupletto H-3 _{eq} ; (d) simpleto CH_3 do OAC; (e) simpleto CH_3 do NAC; (f) tripleto H-3 _{ax} . Lote: IMC0011.....	51
Figura 4.5 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de galactose em D_2O , com DSS (0,0ppm).....	53
Figura 4.6 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de galactose em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) dupletto H-1; (b) sinais referentes aos H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6.....	53
Figura 4.7 - Espectro de RMN de ^1H 400MHz, representativo para ambos os lotes de PSW135 em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm). Lote: IMW0003.....	54
Figura 4.8 - Espectro de RMN de ^1H 400MHz, do PSW135 em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) dupletto H-1'; (b) sinais referentes aos H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6; (c) dupletto H-3 _{eq} ; (d) simpleto CH_3 do NAC; (e) tripleto H-3 _{ax} . Lote: IMW0003.....	54
Figura 4.9 - Gráfico de erro para avaliação dos resultados de pureza obtidos pela sequência padrão de hidrogênio X sequência GARP do PSC.....	63
Figura 4.10 - Gráfico de erro para avaliação dos resultados de concentração de OAc obtidos pela sequência padrão de hidrogênio X sequência GARP do PSC.....	63
Figura 4.11 - Gráfico de erro para avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes sinais do espectro de RMNq de ^1H do PSW135, utilizando a sequência padrão de hidrogênio.....	66
Figura 4.12 - Gráfico de erro para avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes sinais do espectro de RMNq de ^1H do PSW135, utilizando a sequência padrão de hidrogênio.....	67
Figura 4.13 - Eletroferograma referente à introdução da solução de NANA + galactose 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Condições de análise: Coluna de sílica fundida 40 cm x 50 μm , tampão borato 20 mM, pH 9,3, 10 kV, injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 5seg, temperatura de 25°C e tempo de corrida de 10 minutos.....	68
Figura 4.14 - Eletroferograma referente à introdução da solução de NANA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.....	69
Figura 4.15 - Eletroferograma referente à introdução da solução de galactose 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.....	70
Figura 4.16 - Eletroferograma referente à introdução da solução de PSW135 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.....	70
Figura 4.17 - Curva de calibração, utilizando um padrão <i>in house</i> de PSW135.....	71
Figura 4.18 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do solvente D_2O	73
Figura 4.19 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão interno TSP- d_4 , em D_2O	74
Figura 4.20 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz da substância de referência (NANA) em D_2O	74

Figura 4.21 - Curva padrão de NANA para avaliação do parâmetro de linearidade.....	75
Figura 4.22 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados de pureza obtidos pelos métodos de RMN x UV-Vis do PSC.....	83
Figura 4.23 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados de teor de grupos OAc obtidos pelos métodos de RMN x UV-Vis do PSC.....	84
Figura 4.24 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados do percentual de pureza do PSW135 obtidos pelos métodos de RMN, UV-Vis e EC.....	85

RESUMO

Bio-Manguinhos tem sido, nos últimos anos, o único produtor brasileiro de vacinas meningocócicas que são utilizadas para o controle da doença meningocócica. Para garantir a eficácia destas vacinas, são verificados dois fatores determinantes no controle de qualidade: a pureza, dada pela concentração de ácido siálico, e a concentração de *O*-acetil dos polissacarídeos. O polissacarídeo meningocócico C (PSC) é constituído de ácido siálico enquanto o polissacarídeo W135 (PSW135) é constituído de ácido siálico e galactose. O método clássico utilizado no controle destas moléculas é a espectroscopia UV-Vis (Svennerholm e Hestrin), que demanda um grande número de manipulações no preparo das amostras, impactando negativamente no resultado final da análise. A espectroscopia de RMN é capaz de minimizar tal problema, possibilitando, ainda, a redução na quantidade de amostra e tempo de análise, sem a necessidade da construção de uma curva de calibração. O presente trabalho tem como objetivo a utilização de RMN de ^1H para identificação e quantificação (RMNq) dos PSC e PSW135, utilizando o experimento GARP. A identidade das moléculas em estudo foi verificada através da comparação com os espectros dos padrões de ácido siálico (NANA) e galactose, para confirmação dos assinalamentos dos polissacarídeos e da escolha do sinal a ser quantificado, e com os resultados descritos na literatura. Os parâmetros para a quantificação foram otimizados em função da razão sinal/ruído, e o tempo de espera foi determinado usando o método inversão-recuperação. Os parâmetros de aquisição dos espectros quantitativos foram: $d_1 = 25\text{seg}$; $n_s = 64$ e $T = 313\text{K}$. Os sinais utilizados para a quantificação do PSC foram H-7 e H-8 e região em 3,30 a 4,20ppm; e do PSW135 foi o H-3_{eq}. A sequência GARP gerou valores de pureza e teor de OAc menores do que àqueles obtidos com a sequência padrão, mostrando a importância da remoção dos satélites ^{13}C para a quantificação dos analitos. O método de Eletroforese Capilar foi adaptado como método alternativo de quantificação do PSW135, gerando resultados satisfatórios. Foram realizados estudos de pré-validação do método de RMNq para a quantificação do PSW135, o qual atendeu aos requisitos preconizados pela ANVISA. Os resultados obtidos pelos três métodos estudados neste trabalho apresentaram-se satisfatórios, onde ambos os polissacarídeos tem pureza acima de 80% e o PSC possui um teor de OAc acima de $1,5\mu\text{mol/mg}$. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre os três métodos, porém todos podem ser utilizados na quantificação das moléculas. Dentre estes métodos, a RMNq apresenta vantagens pois é um método rápido e capaz de determinar a identidade, pureza e o teor de *O*-acetilação dos polissacarídeos em um único experimento. Em conclusão, o método proposto gera resultados satisfatórios, porém ainda necessita de pequenos ajustes para ser introduzido na rotina de controle de qualidade dos polissacarídeos meningocócicos, utilizados na produção das vacinas meningocócicas polissacarídicas e conjugadas em Bio-Manguinhos.

ABSTRACT

Bio-Manguinhos has been, in recent years, the only producer of meningococcal vaccines that are used for the control of meningococcal disease. To ensure the effectiveness of these vaccines are checked two determining factors in quality control: the purity obtained from the concentration of sialic acid, and the concentration of *O*-acetyl groups. The meningococcal polysaccharide C (PSC) consists of sialic acid while polysaccharide W135 (PSW135) is composed of sialic acid and galactose. The classical method used in the quality control of these molecules is the UV-Vis spectroscopy (Svennerholm and Hestrin), which requires a large number of manipulations in the preparation of the samples, negatively impacting the final result of analysis. NMR spectroscopy is able to minimize this problem, enabling further reduction in the sample amount and analysis time without the need of building a calibration curve. This study aims the use of ^1H NMR to identify and quantify (RMNq) PSC and PSW135, using GARP experiment. The identity of the molecules under study was verified by comparison with the spectra of the sialic acid (NANA) and galactose standards, to confirm the polysaccharides assignments and select the signal to be measured, and with the results described in the literature. The parameters were optimized for the quantification as a function of signal/noise ratio, and delay was determined using the inversion recovery method. The acquisition parameters of quantitative spectra were: $d_1 = 25\text{sec}$; $\tau = 64\text{ ns}$ and $T = 313\text{K}$. The signals used for measurement of PSC were H-7 and H-8 and 3.30 to 4.20 ppm region, and for PSW135 was H-3eq. The GARP sequence generated values of purity and OAc content lower than those obtained with the standard sequence, showing the importance of the removal of satellites ^{13}C for quantification of the analytes. The capillary electrophoresis method was adapted as an alternative method to quantify PSW135, producing satisfactory results. Pre-validation studies were performed for quantification of PSW135 using the qNMR method, which attended the recommended requirements by ANVISA. The results obtained by the three methods were satisfactory, where both polysaccharides have purity above 80% and the PSC has a content of OAc above $1.5\ \mu\text{mol/mg}$. Statistical analysis showed significant differences among three methods, but all can be used in the molecules quantification. Among these methods, the qNMR is advantageous because it is a quick method and be able to determine the identity, purity and degree of polysaccharide *O*-acetylation in a single experiment. In conclusion, the proposed method generates satisfactory results, but still needs minor adjustments to be introduced into the routine quality control of meningococcal polysaccharides used in the production of polysaccharide and conjugate meningococcal vaccines in Bio-Manguinhos.

1- INTRODUÇÃO

1.1- A doença meningocócica

O termo meningite significa a ocorrência de um processo inflamatório das meninges, que são membranas que envolvem o cérebro. Tal processo inflamatório pode ser causado por diferentes agentes infecciosos, conforme apresentado no Quadro 1.1 (Ministério da Saúde, 2009).

Quadro 1.1– Principais agentes etiológicos causadores de meningite (Ministério da Saúde, 2009)

BACTÉRIAS	VÍRUS	OUTROS
<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella sp</i> <i>Enterobacter sp</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Proteus sp</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Leptospira sp</i>	<ul style="list-style-type: none">• Enterovírus• Arbovírus• Vírus do Sarampo• Vírus da Caxumba• Arenavírus• HIV 1• Adenovirus• Vírus do grupo Herpes• Varicela Zoster• Epstein Barr• Citomegalovírus	Fungos <ul style="list-style-type: none">• <i>Cryptococcus neoformans</i>• <i>Candida albicans</i>• <i>C. tropicalis</i> Protozoários <ul style="list-style-type: none">• <i>Toxoplasma gondii</i>• <i>Trypanosoma cruzi</i>• <i>Plasmodium sp</i> Helmintos <ul style="list-style-type: none">• <i>Taenia solium</i>• <i>Cysticercus cellulosae</i>

As meningites causadas por vírus e bactérias são as mais importantes, do ponto de vista da saúde pública, devido a sua ocorrência e o potencial de causarem surtos (Stephens et al., 2007; Ministério da Saúde, 2009). Dentre as meningites bacterianas, destaca-se a meningite meningocócica, causada pela *Neisseria meningitidis* (Ministério da Saúde, 2009):

A meningite meningocócica foi descrita pela primeira vez em 1805, por Vieusseux, ocasião em que foram definidos seus primeiros sintomas clínicos. Tempos depois, suas alterações patológicas foram associadas a estes sintomas, devido ao descobrimento de material purulento na base do cérebro, congestão nos vasos das meninges e exudato sanguíneo na superfície do cérebro de alguns casos fatais (apud Cartwright, 1995).

Em alguns casos, a bactéria pode penetrar à mucosa e atingir a corrente sanguínea, ocasionando uma doença sistêmica, denominada Doença Meningocócica (DM), que apresenta diferentes manifestações clínicas, tais como: pneumonia, meningococemia, epiglote, otite média, conjuntivite, uretrite, meningite, septicemia fulminante e morte (Vedros, 1984; Poolman et al., 1995; Sáfadi et al., 2012a). A meningite meningocócica, forma mais frequente, destaca-se mundialmente por ser uma doença grave devido a sua alta mortalidade, potencial endêmico e rápida evolução, levando o paciente a óbito em pouco tempo (Pollard e Frasch, 2001; Sáfadi, 2006; Stephens et al., 2007; Chang et al., 2012; Sáfadi et al., 2012b).

O quadro clínico, em geral é grave, sendo caracterizado por febre, cefaleia intensa, náusea, vômito, rigidez na nuca, prostração, confusão mental e sinais de inflamação na meníngea acompanhados de alterações no líquido cefalorraquidiano (LCR). Em casos fulminantes, podem ser observados sinais de choque (Joshi et al., 2009; Ministério da Saúde, 2009).

A transmissão ocorre de pessoa a pessoa, através das vias respiratórias, por gotículas e secreções da nasofaringe, necessitando de contato íntimo (residentes da mesma casa; creches e escolas), ou contato direto com secreção respiratória do paciente. Sua susceptibilidade é geral, porém crianças menores de cinco anos e adultos maiores de sessenta anos são mais vulneráveis. Na população, entre 5 e 10% de indivíduos são carreadores assintomáticos da bactéria, onde a mesma permanece como comensal, colonizando a região da nasofaringe (Stephens et al., 2007; Joshi et al., 2009; Ministério da Saúde, 2009; Sáfadi et al., 2012).

O tratamento utiliza antibiótico, que deve ser instituído tão logo seja possível. Além disso, outros tratamentos de suporte devem ser associados, como reposição de líquidos e cuidadosa assistência médica (Stephens et al., 2007; Joshi et al., 2009; Ministério da Saúde, 2009).

Como estratégia de prevenção, utilizam-se vacinas. Tais vacinas são produzidas e utilizadas mundialmente, no calendário básico de vacinação infantil, em casos de surtos ou como indicação para grupos especiais (Silveira, 2007; Ministério da Saúde, 2009).

1.2- Agente etiológico

O agente etiológico da DM foi identificado pela primeira vez em 1887 por Anton Weichselbaum, no fluido cerebrospinal, e posteriormente denominado *Neisseria meningitidis*, também conhecido como meningococo (apud DeVoe, 1992; Pollard, 2004; Lemos, 2005).

Neisseria meningitidis ou meningococo é uma bactéria gram-negativa encapsulada, pertencente à família *Neisseriaceae*. Apresentam-se como diplococos (Figura 1.1), em forma de grãos de café ou aspecto reniforme, são imóveis e não formam endosporo. Seu tamanho varia entre 0,6-1,5 μm , dependendo da idade da cultura e fonte de isolamento. Crescem, preferencialmente, em ambientes com 5-10% de CO_2 entre 35 - 37°C (Morley e Pollard, 2002; Silveira, 2007; Stephens et al., 2007).

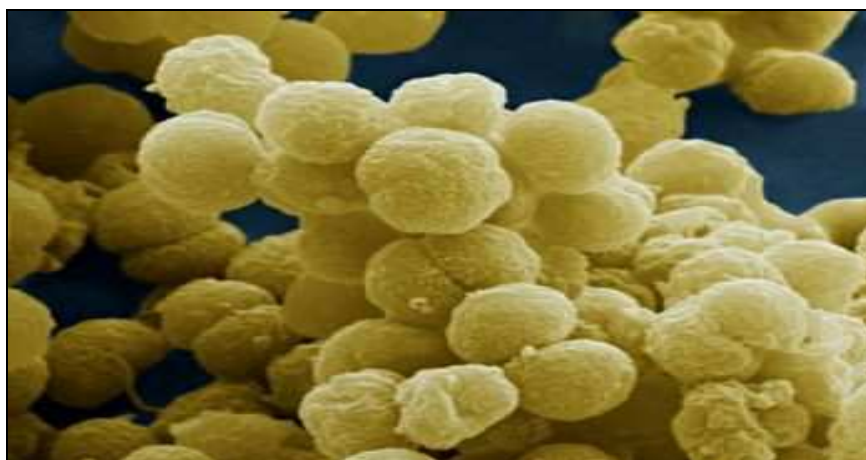


Figura 1.1– Microscopia Eletrônica de Varredura da *N. meningitidis* (Sciencephoto Library, 2012).

N. meningitidis possui uma membrana celular interna (citoplasmática) e outra externa, separadas por uma parede celular composta de peptidoglicano, conforme ilustrado na Figura 1.2. A membrana externa é circundada por uma cápsula polissacarídica contendo numerosas estruturas de proteínas de superfície (Morley e Pollard, 2002). Sua virulência está relacionada com a expressão destas moléculas (Stephens et al., 2007). A cápsula polissacarídica, seu principal fator de virulência, confere resistência à fagocitose e à lise celular mediada pelo sistema complemento, além de oferecer proteção contra o meio externo. As estruturas de proteínas de superfície são capazes de interagir com a célula hospedeira, permitindo sua aderência e controlando o transporte de proteínas para o ambiente intracelular (Morley e Pollard, 2002).

Os meningococos são classificados em sorogrupos com base na composição química e reatividade imunológica de seus polissacarídeos capsulares (Girard et al., 2006; Henriques et al., 2006; Silveira, 2007), em um total de treze sorogrupos descritos até o momento (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W135, X, Y e Z) (Stephens et al., 2007; Hobb et al., 2010; Chang et al., 2012; Safadi et al., 2012).

Para sobreviver como um comensal em humanos ou como um invasor da corrente sanguínea, os meningococos utilizam sofisticados mecanismos genéticos (Tzeng e Stephens, 2000). A estratégia de sobrevivência mais conhecida dos meningococos é a capacidade de troca de material genético responsável pela produção da cápsula polissacarídica, e com isso são capazes de “fugir” da proteção imunológica do organismo hospedeiro. Assim são capazes de mudar do sorogrupo B para o sorogrupo C, e vice-versa, devido à similaridade estrutural entre as duas cápsulas. Essa capacidade de mudança de cápsula torna-se importante devido ao amplo uso de vacinas que induzem uma proteção sorogrupo-específica (Swartley et al., 1997; Conference report, 2007; Silveira, 2007; Sáfadi et al., 2012).

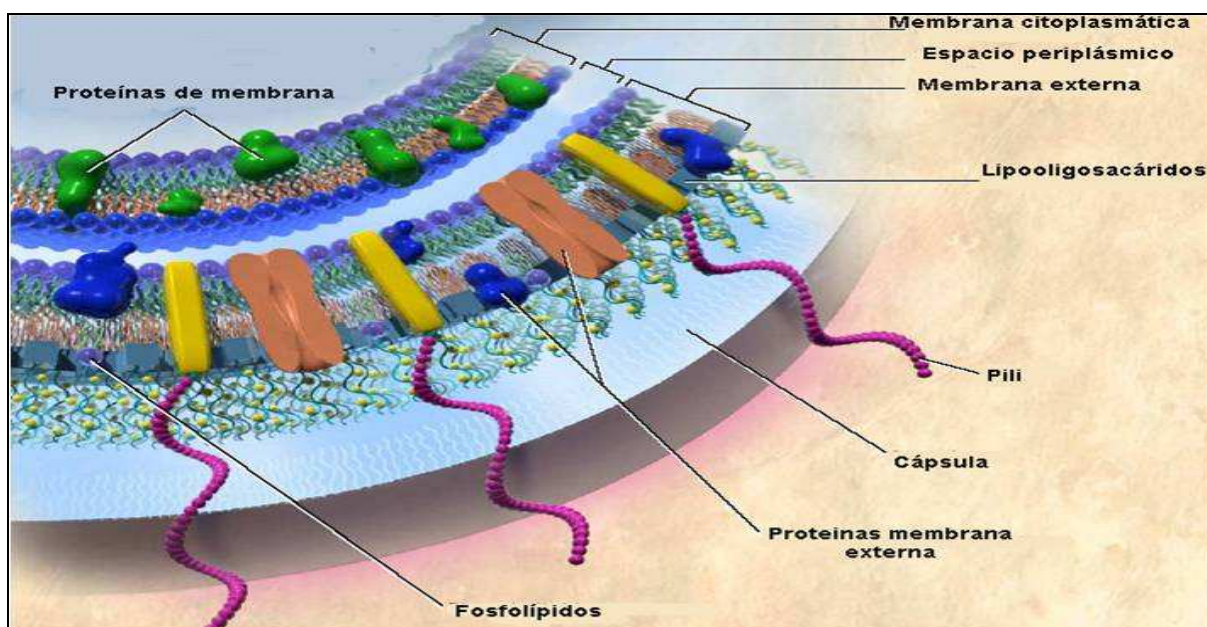


Figura 1.2– Constituição do envelope celular da *N. meningitidis* com seus principais antígenos de superfície (Rosenstein et al., 2001).

1.3- Aspectos epidemiológicos da doença

As infecções por *N. meningitidis*, tanto na forma endêmica quanto na forma epidêmica, estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade em todo mundo. Podem apresentar uma variação na sua incidência, de muito rara a alta, normalmente ocorrendo entre 1 a 12 casos por 100.000 habitantes, principalmente em crianças menores de 2 anos (Riedo et al., 1995; Lemos, 2005; Weidlich et al., 2008). O padrão e taxa de frequência da doença varia entre diferentes

regiões geográficas e também entre a distribuição dos sorogrupos responsáveis (Morley e Pollard, 2002; Pollard, 2004; Stephens et al., 2007; Sáfadi et al., 2012). A doença é comum em regiões de clima temperado e tropicais, com aumento de casos no inverno e na primavera, podendo estar relacionados a doenças do trato respiratório, que são freqüentes nesta época do ano (Goldschneider et al., 1969).

Cinco sorogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, W135 e Y) tem sido responsáveis por mais de 90% dos casos de meningite severa e septicemia em todo mundo (Girard et al., 2006). A proporção de doença meningocócica por sorogrupo e por região é apresentada na Figura 1.3.

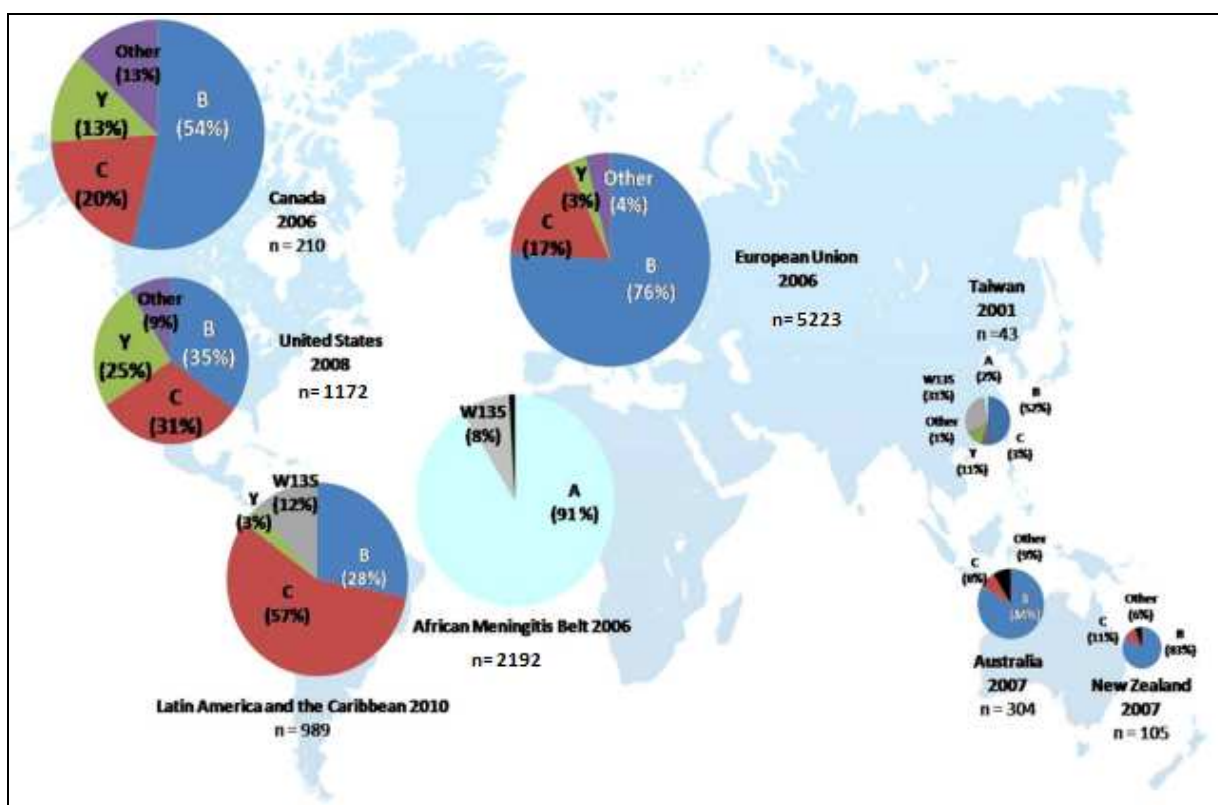


Figura 1.3– Proporção da doença meningocócica por sorogrupo e por região, onde n = número de casos (Halperin et al., 2011).

O sorogrupo A é mais comumente encontrado na Ásia e África. Nesta última, a doença meningocócica tem características epidêmicas e há relatos há mais de 100 anos, principalmente em países do conhecido “cinturão da meningite”, que se encontra abaixo do deserto do Sahara, numa região de savana que vai do leste da Etiópia ao oeste do Senegal (Morley e Pollard, 2002; Safadi e Barros, 2006; Laforce et al., 2009). Nesta região, tal sorogrupo é responsável por 90%

dos casos (Harrison et al., 2009; Halperin et al., 2011). A última grande epidemia causada pelo sorogrupo A ocorreu no período de 1996 – 1997, resultando em mais de 25.000 mortes e cerca de 200.00 casos registrados (Harrison et al., 2009).

Os sorogrupos B e C são os responsáveis pela maioria dos casos da doença em países da Europa e das Américas, também sendo responsáveis por casos na Austrália e Nova Zelândia (Donaldson et al., 1999; Halperin et al., 2011). No período entre 2006 e 2010, dados mostraram que 4435 casos foram identificados, em crianças menores de 5 anos, na Inglaterra e País de Gales, onde mais de 58% foram causados pelo sorogrupo B. O sorogrupo C se caracteriza por acometer a doença, principalmente, em adolescentes e jovens adultos (Stephens et al., 2007). Casos da doença, relacionados por tal sorogrupo, tem sido registrados com alta incidência no continente Americano, principalmente na América do Sul e Caribe, porém um percentual considerável também pode ser observado nos Estados Unidos e Canadá. Na América Latina, o principal país acometido pelo sorogrupo C é o Brasil, registrando um alto percentual de casos nos últimos anos. Argentina, Chile, Venezuela e países do Caribe também registraram o sorogrupo C como um dos principais responsáveis por casos de DM (Harrison et al.; 2009, Halperin et al., 2011).

Desde 2000, o sorogrupo W135 tem sido reconhecido como responsável por surtos da doença meningocócica na região da África. Sua situação epidemiológica vem se complicando, devido a um encontro anual de peregrinos, em Hajj, que culminou em um surto da doença. A cepa responsável por tal surto se espalhou por outros países, gerando uma grande epidemia em Burkina Faso, no ano de 2002 (Taha et al., 2004; Girard et al., 2006; Stephens et al., 2007; Harrison et al., 2009). Durante o período de 2009 e 2010, foram identificados, aproximadamente 462 casos no sul da África (Halperin et al., 2011). Casos da DM causados pelo sorogrupo W135 também têm sido observados na América do Sul, onde a Argentina é o país com o maior percentual de casos oriundos de tal sorogrupo, registrando 28% dos casos no início de 2008 (Harrison et al., 2009; Halperin et al., 2011; Sáfadi et al., 2012).

O sorogrupo Y é responsável por grande proporção de casos da DM ocorridos nos Estados Unidos, sendo classicamente associado a quadros de pneumonia (Koppes et al., 1977). Além dos Estados Unidos, outros países também têm registrado casos de DM relacionados com esse sorogrupo, tais como Canadá, Taiwan e em menor proporção os países da América Latina e Europa. A maioria dos casos esteve presente em pessoas idosas (Halperin et al., 2011; Sáfadi et al., 2012).

Além dos cinco principais sorogrupos causadores da DM, também foram observados casos relacionados com o sorogrupo X. Nos anos de 2009 e 2010 este sorogrupo foi associado a um grande número de casos de DM em adolescentes de Burkina Faso, na África. Desta forma, o número de casos de DM induzidos pelo sorogrupo X alcançou níveis epidêmicos no mundo, o que estimula o desenvolvimento de vacinas efetivas para o controle dos surtos. Estes dois grupos têm se alternado na indução de DM no cinturão da meningite, onde a doença ocorre em ondas epidêmicas (Bröker e Veitch, 2010; Safadi et al., 2012).

No Brasil, segundo Morley e Pollard (2002), a DM foi descrita pela primeira vez no ano de 1906, se caracterizando pela ocorrência de surtos esporádicos, principalmente nos meses mais frios, e tendo registros de casos causados pelos sorogrupos A, B e C. Na década de 70 foi registrada outra grande epidemia, causada pelos sorogrupos A e C, que se iniciou em São Paulo e se alastrou por todo país (Ministério da Saúde, 2005; Sáfadi et al., 2012). Essa epidemia foi controlada com a realização de uma campanha nacional de vacinação, que só foi possível com a criação de Bio-Manguinhos, e a transferência de tecnologia da produção da vacina meningocócica AC do Instituto Merieux (França), em 1976 (Noronha et al., 1995; Barbosa, 2009). Na década de 80, ocorreu uma diminuição na incidência do sorogrupo A e uma prevalência de 83% de DM causada pelo sorogrupo B. A década de 90 foi caracterizada pela diminuição proporcional do sorogrupo B e um aumento progressivo do sorogrupo C. A partir do ano de 2002, houve um aumento na proporção de casos associados a este sorogrupo, prevalecendo até hoje. Recentemente foram relatados casos associados ao sorogrupo W135 em São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. O sorogrupo C é o causador, de maior frequência, da DM no Brasil. No ano de 2010, este sorogrupo foi responsável por 75% dos casos identificados, enquanto somente 6% foram provocados pelo sorogrupo W135 (Halperin et al., 2011; Sáfadi et al., 2012).

1.4- Vacinas meningocócicas

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), vacina é definida como produto biológico que contem uma ou mais substâncias antigênicas que, quando inoculadas, são capazes de induzir imunidade específica ativa e com isso proteger contra doença causada pelo agente infeccioso que originou o antígeno.

Inicialmente, as vacinas foram baseadas em preparações utilizando uma suspensão de células bacterianas inativadas, através de calor. Embora esses métodos ainda sejam eficazes e utilizados para algumas vacinas, a descoberta de uma “substância solúvel específica” (polissacarídeo capsular) secretada por pneumococos durante seu crescimento e com atividade imunogênica, abriu as portas para um novo e importante desenvolvimento na tecnologia de vacinas. Essa nova tecnologia veio para minimizar as reações adversas (provavelmente ocasionadas pelo alto nível de endotoxinas) causadas pela utilização de suspensão de bactérias inativadas e para alcançar melhor eficácia (Jennings, 1983; Frasch, 1990; Morley e Pollard, 2002).

A primeira vacina meningocócica polissacarídica, de sucesso, contra sorogrupos A e C foi desenvolvida em resposta a uma epidemia ocorrida entre militares dos Estados Unidos no ano de 1960, por uma cepa que se tornou resistente ao antibiótico sulfonamida. Nesse período, os procedimentos de cultivo da bactéria e os processos de purificação dos polissacarídeos foram otimizados, com o objetivo de produzir vacinas (Gotschlich et al., 1969). As vacinas polissacarídicas constituíram as primeiras vacinas bacterianas definidas quimicamente (Difabio, 1988; Frasch, 1990; Rosenstein et al., 2001; Joshi et al., 2009).

Apesar do sucesso alcançado com o desenvolvimento das vacinas meningocócicas polissacarídicas, foi observado que tais vacinas possuíam uma eficácia limitada atribuída a dois fatores (Frasch, 1990; Morley e Pollard, 2002; Sáfadi et al., 2012):

1- Baixa imunogenicidade em crianças menores de dois anos devido à ausência de maturidade do seu sistema imunológico;

2- Não indução de memória imunológica, proporcionando uma proteção de curta duração em adultos e crianças maiores de dois anos. Devido a isso, as vacinas polissacarídicas não são utilizadas de maneira rotineira, estando indicada para grupos de alto risco ou epidemias.

Para reverter essas limitações, foram desenvolvidas vacinas conjugadas com proteínas carreadoras, tais como anatoxina tetânica ou diftérica, que são capazes de induzir uma resposta imunológica mais eficaz e duradoura (Richmond et al., 2000a e 2000b; Borrow et al., 2001; Silveira, 2007; Chang et al., 2012).

Atualmente, as vacinas meningocócicas podem ser polissacarídicas ou conjugadas com proteínas, sendo específicas para cada sorogrupo com base na reação imunogênica do hospedeiro ao polissacarídeo (Ministerio da Saude, 2009).

Até os dias de hoje, as vacinas polissacarídicas contra *N. meningitidis* são produzidas e utilizadas mundialmente, em casos de surtos epidêmicos. Essas vacinas podem ser monovalentes (A ou C), bivalentes (AC), trivalentes (ACW135), ou até mesmo tetravalentes (ACW135Y). As vacinas monovalentes e bivalentes são produzidas em alguns países da Europa, como a França, por exemplo. A tetravalente tem sido produzida nos Estados Unidos, Bélgica e França. No Brasil, Bio-Manguinhos tem sido, nos últimos 36 anos, o único produtor brasileiro de vacinas meningocócicas monovalentes (A ou C), bivalentes (AC) (figura 1.4) ou trivalentes (ACW135).

Em relação às vacinas conjugadas, Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina conjugada brasileira contra *N.meningitidis* do sorogrupo C há 13 anos, utilizando o método modificado de aminação redutiva (Jennings & Lugowski, 1981; Lee Che-H & Frasch, 2005; Jessouroun et al., 2005; Silveira et al., 2007). Esta vacina apresentou resultados satisfatórios de reatogenicidade e imunogenicidade em indivíduos saudáveis, em estudos clínicos de Fase I e II, em comparação com uma vacina comercial e será avaliada em estudos clínicos de Fase III em 2013.



Figura 1.4- Vacina contra meningite A e C – 10 doses, produzida por Bio-Manguinhos

A produção dos polissacarídeos utilizados na formulação da vacina polissacarídica de Bio-Manguinhos acontece em parceria com o Instituto Finlay, localizado em Cuba. Tal Instituto produz os polissacarídeos utilizando a metodologia de precipitação alcoólica fracionada e realiza os testes de controle de qualidade, de acordo com os requerimentos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e as normas vigentes no Brasil, e os envia para Bio-Manguinhos, onde novamente é realizado o controle de qualidade (Gotschlich et al., 1969; WHO 1976; WHO 1978; WHO 1981; WHO 2004). Após a comprovação de todos os resultados satisfatórios, os mesmos são utilizados na formulação da vacina. Entretanto, no desenvolvimento da Vacina meningocócica C Conjugada, Bio-Manguinhos produz os polissacarídeos purificados por uma nova tecnologia

desenvolvida recentemente, que utiliza um processo de extração cromatográfica, com finalidade de filtração.

1.5- Polissacarídeos meningocócicos

Polissacarídeos capsulares são estruturas externas, presentes na superfície bacteriana, e como tal desempenham um papel chave na interação entre patógeno e hospedeiro. Trata-se de moléculas puras, sem presença de massa bacteriana e atóxica. Os polissacarídeos produzidos por diferentes sorogrupos de *N. meningitidis*, constituem antígenos específicos para a vacina meningocócica e possuem estruturas químicas diferenciadas entre si (Difabio, 1988).

Na década de 30 foram descobertos os primeiros polissacarídeos, que após serem isolados foram testados em animais com o objetivo de buscar proteção contra a doença meningocócica. As primeiras técnicas de produção de polissacarídeo, baseadas em longo tempo de cultivos, originavam produtos de baixo peso molecular que eram ineficazes para estimular a produção de anticorpos em modelos animais. Na década de 60, as técnicas de produção e purificação de polissacarídeos foram otimizadas, passando a gerar polissacarídeos de alto peso molecular e capazes de induzir uma resposta imunológica em modelos animais. O processo de produção otimizado foi descrito por Gotschlich et al. (1969), passando a ser recomendado pela OMS para a produção de vacinas polissacarídicas, sendo utilizado até hoje (Scherp e Rake, 1945; WHO, 1981; Morley e Pollard, 2002; Silveira, 2007).

Os polissacarídeos capsulares meningocócicos são compostos de unidades sacarídicas, podendo formar um homopolímero linear, composto de uma única substância química, como no caso do sorogrupo C (Figura 1.5 (a)); ou um heteropolímero linear, composto por dois ou mais monossacarídeos, como o sorogrupo W135 (Figura 1.5 (b)). O sorogrupo A é composto de unidades repetidas de *N*-acetilmanosamina-1-fosfato com ligação $\alpha 1 \rightarrow 6$. Os sorogrupos B e C são homopolímeros de unidades repetidas de ácido *N*-acetil neuramínico (um tipo de ácido siálico - NANA), com ligações glicosílicas $\alpha 2 \rightarrow 8$ e $\alpha 2 \rightarrow 9$, respectivamente, sendo o sorogrupo C *O*-acetilado. Os sorogrupos Y e W135 são heteropolímeros, sendo o Y composto de unidades repetidas de dissacarídeos de ácido siálico e glicose, e o W135 composto de unidades repetidas de dissacarídeos de ácido siálico e galactose, podendo ou não ser *O*-acetilado, dependendo da cepa (Bundle et al., 1974; Bhattacharjee et al., 1975; Morley e Pollard, 2002; Henriques et al.,

2006; Gudlavalleti et al., 2007; Hobb et al., 2010; Chang et al., 2012). As estruturas químicas de tais sorogrupos são apresentadas no Quadro 1.2.

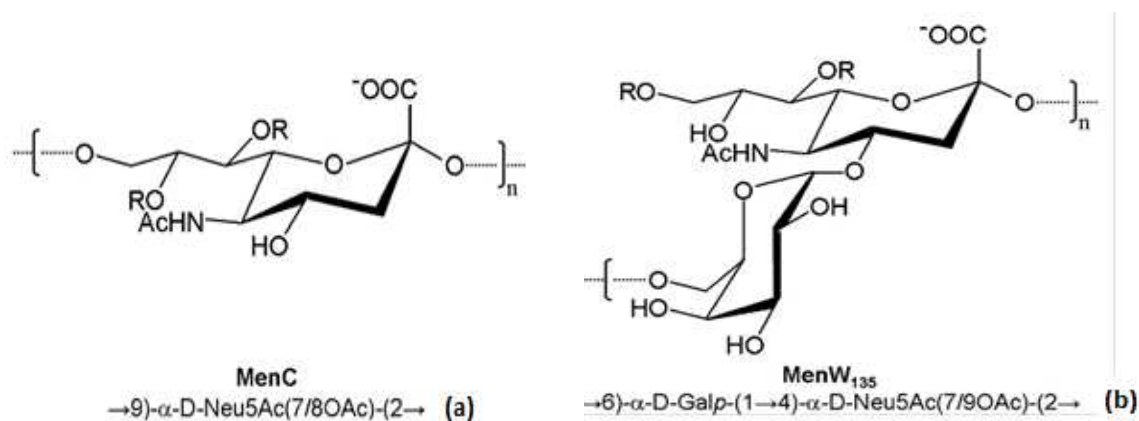


Figura 1.5- Estrutura química dos polissacarídeos meningocócicos (a) sorogrupo C e (b) sorogrupo W135 (Gudlavalleti et al., 2007; Broker et al., 2009)

Quadro 1.2- Estrutura química dos polissacarídeos encontrados nos sorogrupos mais frequentemente associados à doença meningocócica. (Bastos, 2005)

POLISSACARÍDEOS MENINGOCÓCICOS			
Sorogrupo	Unidade	Ligação	Localização O-acetil
A	$\rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-ManpNac-1(PO}_4\rightarrow$	$\alpha\text{-}(1\rightarrow 6)$	C-3 de manosamina
B	$\rightarrow 8\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 8)$	Ausente
C	$\rightarrow 9\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac-(2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 9)$	C-7 e C-8 do ácido siálico
Y	$\rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-Nac-(1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 6)$	C-3 e C-4 da Glcp C-7 do ácido siálico
W135	$\rightarrow 6\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-NeupNac-2}\rightarrow$	$\alpha\text{-}(2\rightarrow 6)$	C-7 e C-9 do ácido siálico

Podem variar, significativamente a sua capacidade para estimular produção de anticorpos específicos. Como regra geral, os polissacarídeos que apresentam uma constante de distribuição (Kd) menor que 0,5 em cromatografia de exclusão molecular são considerados bons imunógenos, enquanto que polissacarídeos com Kd maior que 0,5, em tampão fosfato com acetonitrila 15% pH 7 e coluna G4000, são pouco imunogênicos (Lee, 1987; Farmacopéia Européia, 2005; Moore et al., 2007).

Os polissacarídeos podem se apresentar *O*-acetilados. Estes grupos podem estar presentes em hidroxilas adjacentes no anel piranosídico do açúcar. O grau de acetilação das hidroxilas é variável, podendo ser atribuído às diferentes condições de crescimento da cepa e processos de produção dos polissacarídeos. No sorogrupo C, os grupos OAc geralmente se apresentam nos carbonos 7 e 8, e no sorogrupo W135, nos carbonos 7 e 9 (Bhattacharjee et al., 1975; Kao e Tsai, 2004; Jones, 2005).

Muito tem se pesquisado a respeito da importância dos grupos OAc na estimulação de produção de anticorpos contra os polissacarídeos meningocócicos. Estudos têm apontado, que tanto para o sorogrupo C, como para o sorogrupo W135, a imunogenicidade não é afetada pelo grau de *O*-acetilação do polissacarídeo (Jones e Lemercinier, 2002; Longworth et al., 2002; Kao e Tsai, 2004; Gudlavalleti et al., 2007).

1.6- Controle de Qualidade de vacinas meningocócicas

Desde 1976, a OMS tem descrito recomendações de produção e controle de qualidade para a vacina meningocócica. Tais recomendações constituem um “guia” para autoridades de controle nacional e para produtores da vacina. Conforme descrito no requerimento, o controle de qualidade da vacina é baseado na pureza de seus componentes, no processo de síntese e na composição do produto final. Os métodos de análises utilizados são métodos clássicos, estabelecidos pelos requerimentos da OMS, e também descritos na Farmacopéia Européia (2005). (WHO, 1976; WHO, 1978; WHO, 1981; Jodar et al., 2004).

Para que a qualidade das vacinas meningocócicas (tanto a polissacarídica quanto a conjugada) seja garantida, o controle de qualidade inicia-se com testes nos polissacarídeos utilizados na formulação da vacina. Tais testes têm como objetivo avaliar a conformidade dos polissacarídeos purificados. Os parâmetros das análises físico-químicas, para os polissacarídeos sorogrupos C e W135, são descritos a seguir:

Conteúdo protéico: determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão, deve ser menor que 10mg/g de polissacarídeo.

Conteúdo de ácido nucléico: determinado por espectrofotometria UV-Vis, no comprimento de onda de 260nm, num caminho ótico de 1 cm, assumindo que a absorvância de uma solução 10g/L de ácido nucléico é 200. O conteúdo deve ser menor que 10mg por grama de polissacarídeo.

Concentração de *O*-acetil: determinada pelo método de Hestrin (1949), utilizando cloreto de acetilcolina como padrão, deve ser maior que 1,5 $\mu\text{mol/mg}$ de polissacarídeo para o sorogrupo C, e 0,3 $\mu\text{mol/mg}$ de polissacarídeo para o sorogrupo W135.

Concentração de ácido siálico: determinada pelo método de Svennerholm (1957), utilizando ácido *N*-acetil neuramínico como padrão, deve ser maior que 800mg/g de polissacarídeo para o sorogrupo C e 560mg/g de polissacarídeo para o sorogrupo W135.

Percentual da distribuição do peso molecular: determinada em cromatografia de alta performance por exclusão de tamanho molecular (HPSEC – High Performance Size Exclusion Chromatography), mais de 75% deve eluir antes do K_d 0,5 para o sorogrupo C, e mais de 80% deve eluir antes do K_d 0,5 para o sorogrupo W135; em tampão fosfato com acetonitrila 15% pH 7 e coluna G4000.

A maioria das análises físico-químicas, de controle de qualidade dos polissacarídeos meningocócicos, utiliza ensaios colorimétricos realizados através da técnica de espectrofotometria UV-Vis, que segue o princípio da Lei de Beer-Lambert (base matemática para medidas de absorção de radiação pelas amostras). A espectrofotometria UV-Vis é um método clássico de análise e possui uma ampla aplicação em laboratórios de controle de qualidade, tanto para fins qualitativos quanto para fins quantitativos, sendo muito empregada em quantificações diretas de moléculas orgânicas e inorgânicas, proteínas e ácidos nucléicos. Trata-se de uma técnica reconhecida por apresentar uma simplicidade e um baixo custo operacional, ter uma boa sensibilidade, além de gerar resultados de fácil interpretação. Como qualquer outra técnica, a espectrofotometria UV-Vis também apresenta algumas desvantagens, que estão relacionadas com sua baixa seletividade. Esta característica faz com que a ocorrência de sobreposição espectral seja bastante frequente (Rocha e Teixeira, 2004). Outra desvantagem, diretamente relacionada à sua utilização no controle de qualidade dos polissacarídeos, é ao quantitativo de amostra e ao grande

número de manipulação da mesma, que acarreta em uma maior probabilidade de erro. Para a utilização dessa técnica, faz-se necessário um quantitativo de 100mg de amostra que será dissolvida em água para originar uma solução estoque. A partir desta solução é realizada outra diluição para dar origem à solução de trabalho. Além disto, deve ser construída uma curva de calibração utilizando uma substância de referência comercial e a utilização de um padrão *in house* para controle da análise.

Atualmente, vem sendo proposta a substituição de métodos clássicos de análise por métodos físico-químicos mais modernos, tais como: eletroforese capilar (EC) e ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H) (Jodar et al., 2004; Holzgrabe et al., 2005).

No caso da Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), a Farmacopéia Européia (2005) indica a sua utilização em substituição às provas sorológicas para os polissacarídeos do sorogrupo C na produção de vacinas conjugadas. Além da Farmacopéia Europeia, vários artigos (Lemercinier e Jones, 1996; Jones e Lemercinier, 2002; Jodar et al., 2004; Bardotti et al., 2005; Jones, 2005; Xu et al., 2005a; Cuello et al., 2007; Gudlavalleti et al., 2007; Silveira et al., 2007; Bardotti et al., 2008; Garrido et al., 2012; Vipond et al., 2012) vêm propondo a substituição de métodos clássicos utilizados para a verificação da identidade e da pureza dos polissacarídeos, pela espectroscopia de RMN de ^1H .

1.7- Eletroforese Capilar (EC)

A eletroforese capilar é uma técnica de separação e análise de substâncias baseada na migração de compostos iônicos/ionizáveis através de um campo elétrico, dentro de um capilar preenchido com eletrólitos condutores adequados. Apresenta diversos modos de separação, cada um sendo mais adequado dependendo do tipo de amostra que está sendo analisada. São eles: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoeletrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e eletrocromatografia capilar (CEC). As vantagens dessa técnica estão relacionadas à sua simplicidade instrumental e completa automação da análise (injeção e detecção em fluxo), à compatibilidade com uma variedade de sistemas de detecção e à possibilidade de diferentes modos de separação em uma única coluna. Além disso, possui um rápido tempo de análise utilizando volumes bastante reduzidos de amostras (na ordem de nanolitros). Como desvantagem, podemos dizer que essa técnica necessita de um grande tempo para o condicionamento do capilar,

e caso esse condicionamento não seja realizado de forma correta, não é possível obter resultados reprodutíveis (Tavares, 1996; Kannamkumarath et al., 2002; Lamb et al., 2005; Ribani et al., 2004; Souza, 2011).

EC vem sendo utilizada, com sucesso, em uma enorme variedade de áreas, sendo a mais frequente a análise de produtos farmacêuticos. Análises de DNA e ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos são suas utilizações mais populares. Esta técnica vem se destacando na química analítica pela sua capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras farmacêuticas e biológicas (Altria, 1999; Lamb et al., 2005).

Além das utilizações acima citadas, a EC tem sido apontada como uma boa opção no controle de qualidade das vacinas meningocócicas. A OMS sugere que a determinação da quantidade de proteína livre na composição da vacina meningocócica conjugada seja realizada por métodos como cromatografia líquida de alta performance (CLAE) ou eletroforese capilar. Na literatura, a EC também é indicada para a separação de proteína livre, não só na vacina conjugada meningocócica, como também na vacina conjugada contra pneumococos; além de ser uma boa opção para separação e quantificação de polissacarídeos de diferentes sorogrupos da *N. meningitidis*. Para as análises de proteínas livres em vacinas conjugadas, são descritas a utilização da CZE e da MEKC, enquanto para as análises de quantificação de polissacarídeos utiliza-se apenas a CZE (Lamb et al., 2000; Lamb et al., 2005; Souza, 2011).

1.8- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN é um método analítico, em particular, adequado para a elucidação de estruturas químicas de moléculas orgânicas e inorgânicas pela interpretação de seus espectros uni e bidimensionais, originados pelos mais diferentes núcleos como, por exemplo, ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P , ^{11}B , ^{119}Sn ; sendo ^1H e ^{13}C os mais utilizados na química orgânica. A RMN apresenta uma série de vantagens em relação às demais técnicas espectroscópicas como: fácil execução, rápido tempo de análise, podendo ser utilizada tanto para amostras sólidas quanto para amostras líquidas, preservação da amostra, a utilização de pouca quantidade de amostra (5 a 10mg, em sonda de 5mm) e a necessidade de um preparo mínimo da amostra (dissolução em solvente deuterado adequado). É considerado um método primário de análise, pois não necessita utilizar um padrão de referência (Pavia et al., 2001; Farmacopeia Europeia, 2005; Holzgrabe et

al., 2005; Holzgrabe, 2010). Como desvantagem podemos dizer que é uma técnica relativamente cara quando comparada às técnicas tradicionais.

Atualmente é um dos métodos mais importantes e muito utilizado em trabalhos acadêmicos/científicos e nas indústrias, pois permite em um único experimento a determinação qualitativa e quantitativa da estrutura molecular (Malz & Jancke, 2005; Santos e Colnago, 2013).

Na indústria farmacêutica, a RMN tem sido utilizada no controle de qualidade de medicamentos com diversas finalidades (Holzgrabe, 2010):

- Identificação de substâncias;
- Elucidação de estruturas químicas;
- Determinação do nível de impurezas e/ou princípios ativos;
- Determinação da composição de fármacos multicomponentes;
- Determinação da composição isomérica de uma mistura;
- Observação do curso de degradação / decomposição inerentes à impurezas e princípios ativos;
- Avaliação do teor de solventes residuais, e
- Análise de falsificações e contaminações.

No campo das vacinas polissacarídicas, importantes ganhos foram obtidos através da utilização da RMN. Os primeiros trabalhos datam de 1975, como a elucidação das estruturas dos polissacarídeos (Bhattacharjee et al., 1975). Em 1996, Lemercinier e Jones publicaram o completo assinalamento do espectro de RMN de ^1H e detalhamento dos padrões de *O*-acetilação para os polissacarídeos meningocócicos utilizados na produção de vacina meningocócica. Tais assinalamentos são considerados uma referência padrão para as análises de identidade e controle de qualidade de polissacarídeos bacterianos utilizados na produção de vacinas, especialmente nos polissacarídeos oriundos da *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella typhi*. Além disso, tem sido considerada uma ferramenta valiosa para o acompanhamento da produção de vacinas glicoconjugadas e no controle de degradação de polissacarídeos (Jones e Lemercinier, 2002; Holzgrabe, 2010).

1.8.1- Princípios da Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq)

Sob condições apropriadas de aquisição, a área de um sinal no espectro de RMN (I_x) é diretamente proporcional ao número de núcleos (N_x) que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal, de acordo com a Equação 1.1.

$$I_x = K_{aq} N_x \quad (1.1)$$

Onde:

I_x = Integral da área do sinal;

K_{aq} = constante do espectrômetro que engloba diversos parâmetros de aquisição dos espectros em função das características da amostra. Quando a K_{aq} é mantida constante, pode ser eliminada da Equação;

N_x = número de núcleos associados ao sinal.

Assim, para a obtenção do teor de um analito (Figura 1.6) em uma mistura é necessário o uso de um padrão interno (PI), como o Trimetilsilil propionato de sódio (TSP- d_4), com pureza conhecida e, a partir da razão da área dos sinais correspondente ao padrão interno e da área do analito, efetuar o cálculo descrito na Equação 1.2:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{PI}} \frac{N_{PI}}{N_x} \frac{M_x}{M_{PI}} \frac{m_{PI}}{m} \quad (1.2)$$

Na qual: x = *analito*; P = pureza ; I = área do sinal de ressonância; N = número de núcleos que absorvem na frequência do sinal de ressonância; M = massa molar; m = massa de amostra. (Soininen, 2008; Borges, 2009; Holzgrabe, 2010; Martino e Holzgrabe, 2011; Santos e Colnago, 2013).

Para que a RMN possa ser utilizada com fins quantitativos, cinco pré-requisitos devem ser avaliados e/ou otimizados para cada analito, com o objetivo de garantir um resultado preciso e exato (Holzgrabe, 2010).

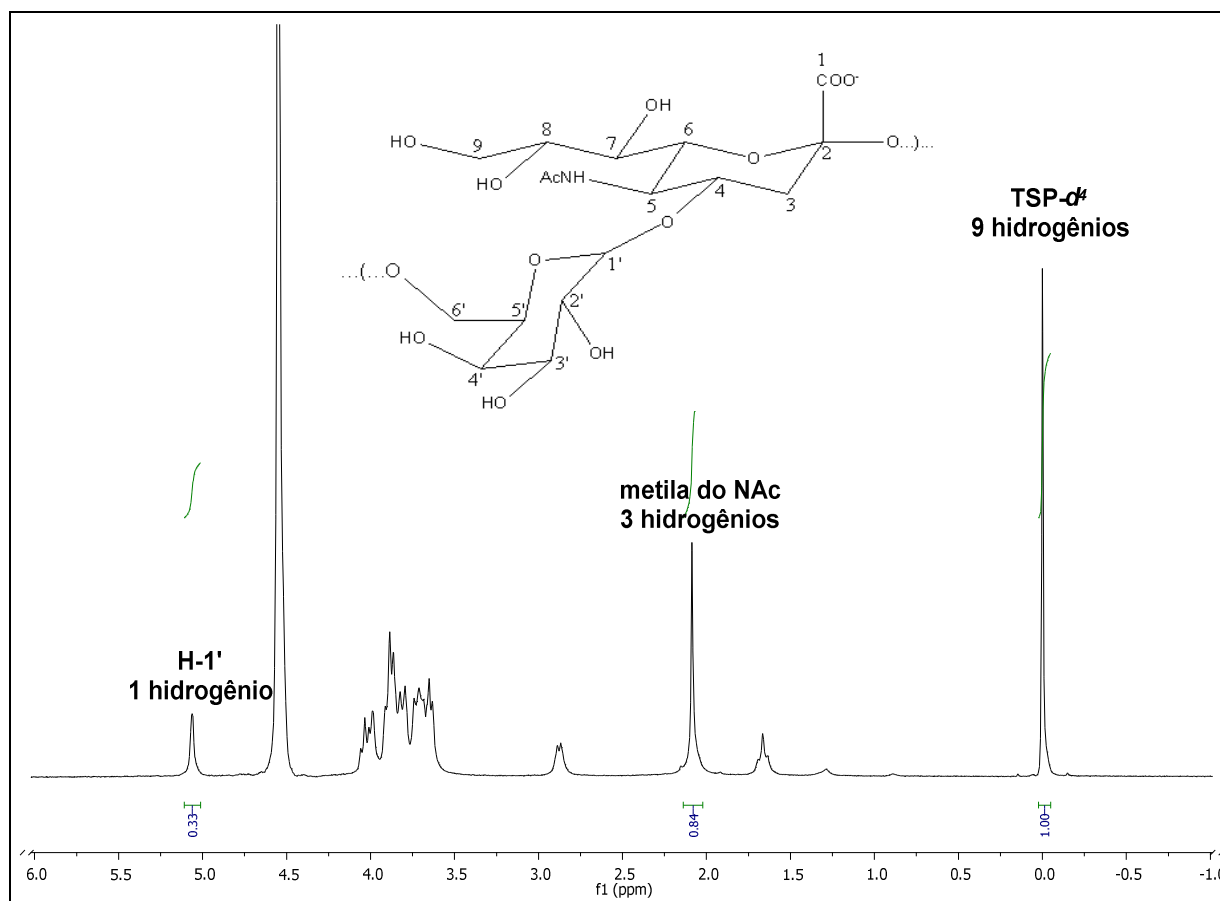


Figura 1.6 – Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O , com $\text{TSP-}d_4$. O sinal referente ao $\text{TSP-}d_4$ (em 0,00ppm) é gerado por 9 núcleos, apresentando uma maior intensidade em relação ao sinal referente à metila do NAc (em 2,10ppm), que é gerado por 3 núcleos e ao sinal referente ao H-1' (5,10ppm), que é gerado pelo hidrogênio 1 do monômero galactose.

Pré-requisito 1) “Pureza do sinal”: O sinal utilizado para a quantificação deve estar claramente separado dos outros sinais e ser o mais simples possível. Desta forma, o simpleto é o sinal mais apropriado, conforme ilustrado na Figura 1.7 (Holzgrabe et al., 2005; Borges, 2009; Holzgrabe, 2010).

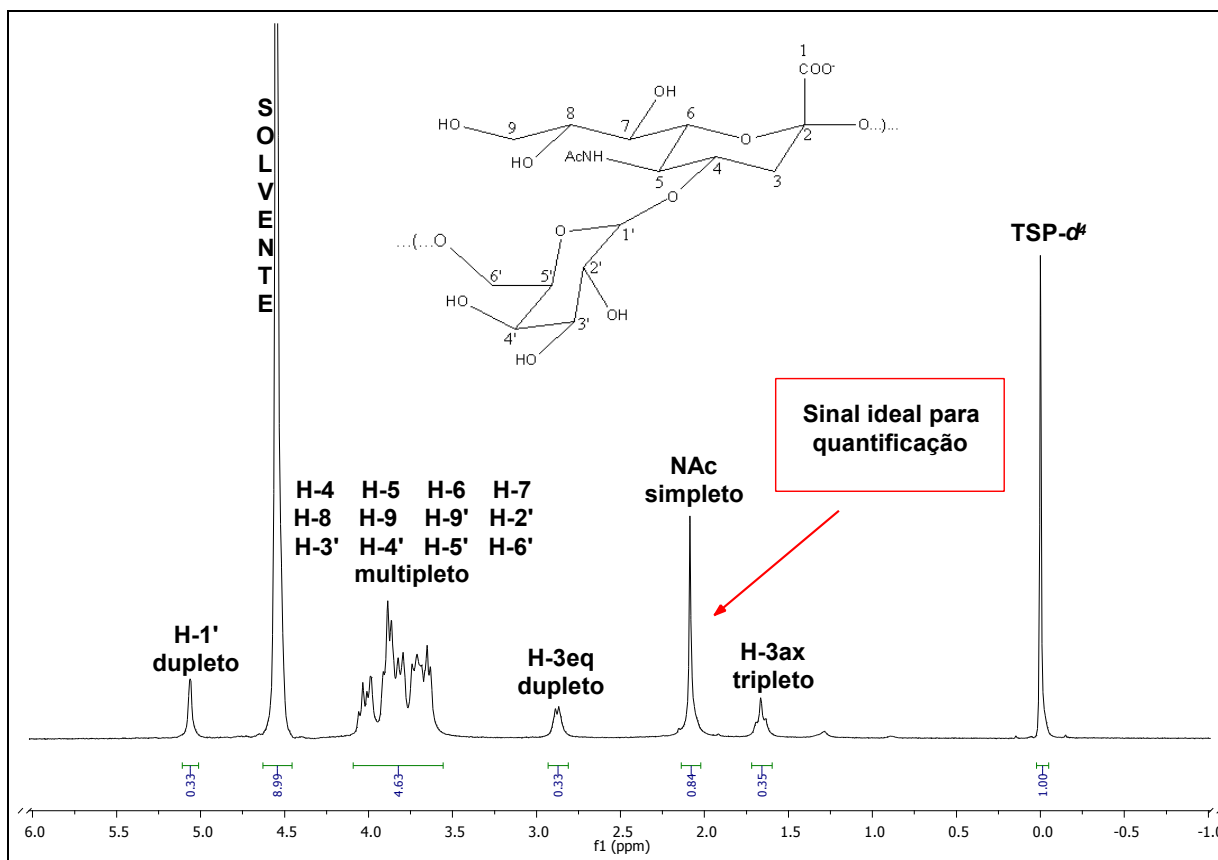


Figura 1.7 – Espectro parcial de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm).

Pré-requisito 2) Presença dos satélites: a presença de satélites ^{13}C e ^{29}Si podem interferir no sinal utilizado para a quantificação. A sobreposição dos satélites com os sinais do analito ou com sinais de possíveis impurezas presentes na amostra alteram a área a ser quantificada (Figura 1.8). A área dos satélites deve ser subtraída nos cálculos ou experimentos com desacoplamento desses sinais devem ser utilizados, tais como o *Globally Optimized Alternating-Phase Rectangular Pulses* (GARP). Isto é de fundamental importância, no caso de experimentos de quantificação de impureza em quantidade menor que 0,2%, nos quais o componente principal esteja em quantidades acima de 99% (Holzgrabe, 2010).

GARP é uma sequência de desacoplamento heteronuclear de núcleos, sendo muito utilizada com o objetivo de remover satélites de ^{13}C , em espectros unidimensionais de RMN de ^1H . O desacoplamento dos sinais de ^{13}C é realizado durante o tempo de aquisição (AQ) do decaimento livre de indução (FID) por irradiação no centro de frequência de carbono (Figura 1.9). Como resultado o espectro de RMN de ^1H é obtido sem os sinais dos satélites, conforme

demonstrado na Figura 1.10. Este experimento torna a integral dos sinais a serem utilizados na quantificação mais exata (Pauli et al., 2007; Bharti e Roy, 2012).

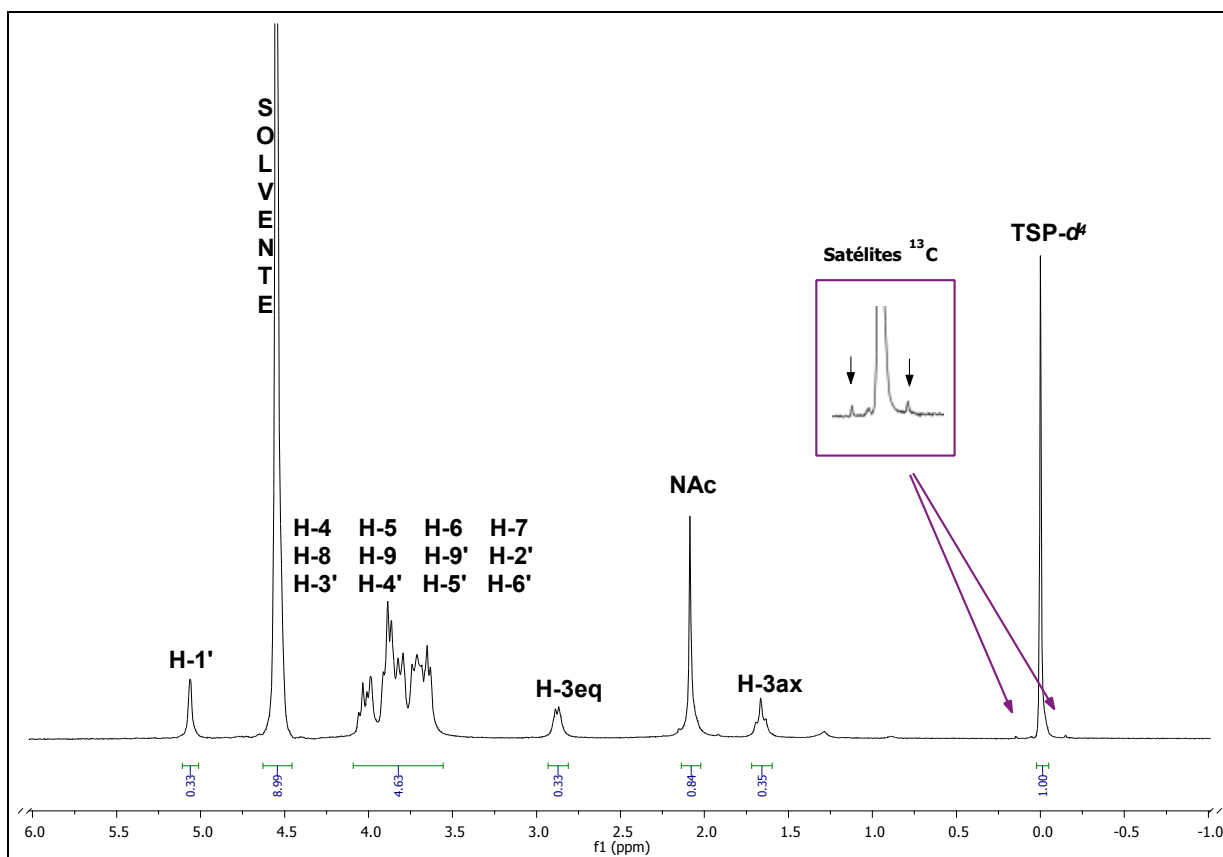


Figura 1.8 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do PSW135 em D_2O . Presença de satélites de ^{13}C no sinal em 0ppm, referente ao padrão TSP- d_4 .

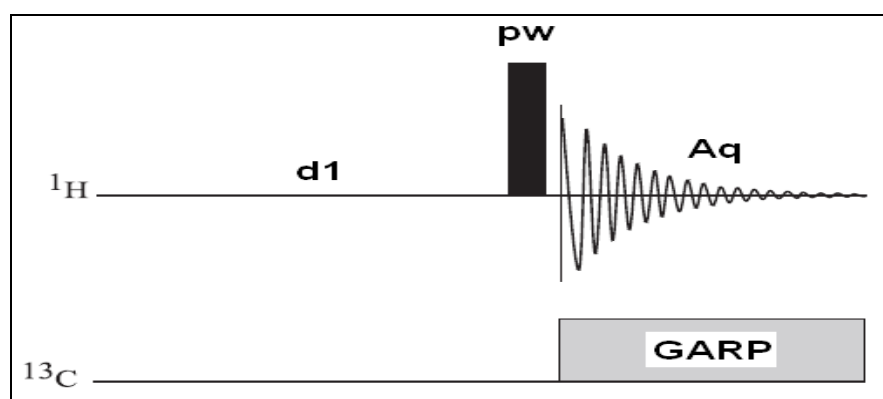


Figura 1.9 – Representação gráfica de um pulso de RMN de ^1H com esquema de desacoplamento de banda larga na região de ^{13}C para eliminar os satélites de ^{13}C de um espectro unidimensional de RMN de ^1H (Sequência GARP).

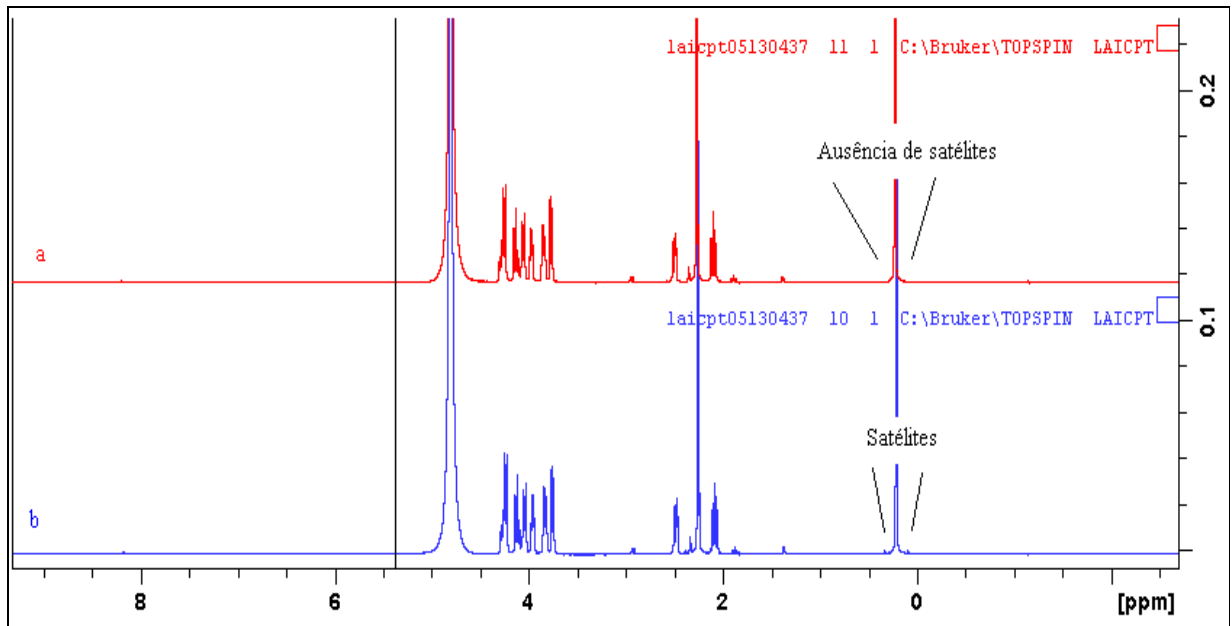


Figura 1.10 – Espectros de RMN de ^1H , 500MHz do padrão NANA em D_2O . (a) espectro obtido utilizando sequência GARP; (b) espectro obtido utilizando sequência padrão de hidrogênio.

Pré-requisito 3) Aquisição de espectro sem rotação de amostra. A rotação da amostra, durante a obtenção do espectro quantitativo, pode interferir na resolução do sinal utilizado, gerando pequenos sinais indesejáveis conhecidos como bandas laterais, o que geraria erros no resultado final da quantificação. (Soininen, 2008; Holzgrabe, 2010).

Pré-requisito 4) A constante K_{aq} (Equação 1.1) que compreende uma série de parâmetros de aquisição que devem ser ajustados (Soininen, 2008; Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012) como:

- O pulso de excitação deve ser uniforme em toda janela espectral de interesse. Para tal os pulsos duros, normalmente utilizados na aquisição de espectros de RMN de ^1H devem estar calibrados. Os pulsos de excitação uniforme garantem que não haja interferência das bandas de excitação lateral nas extremidades da janela espectral (Figura 1.11). No caso de experimentos quantitativos, deve-se utilizar uma região adicional de 2 a 3 ppm nas extremidades da janela espectral, e o pulso de excitação dado no centro da janela espectral (Holzgrabe, 2010).

- AQ é período de tempo necessário para recolher os dados de um único FID. AQ deve ser suficientemente longo de modo a incluir o decaimento completo até o ruído, a fim de evitar um possível truncamento do FID, o que geraria medidas de intensidade inexatas. O espaçamento de

tempo entre pontos de dados sucessivos amostrados no FID é chamado o tempo de permanência (DW). O tempo total de aquisição é o produto do espaçamento de tempo entre pontos (DW) e o número de pontos (TD), que determina a resolução do espectro após a Transformada de Fourier (FT) (Figura 1.12).

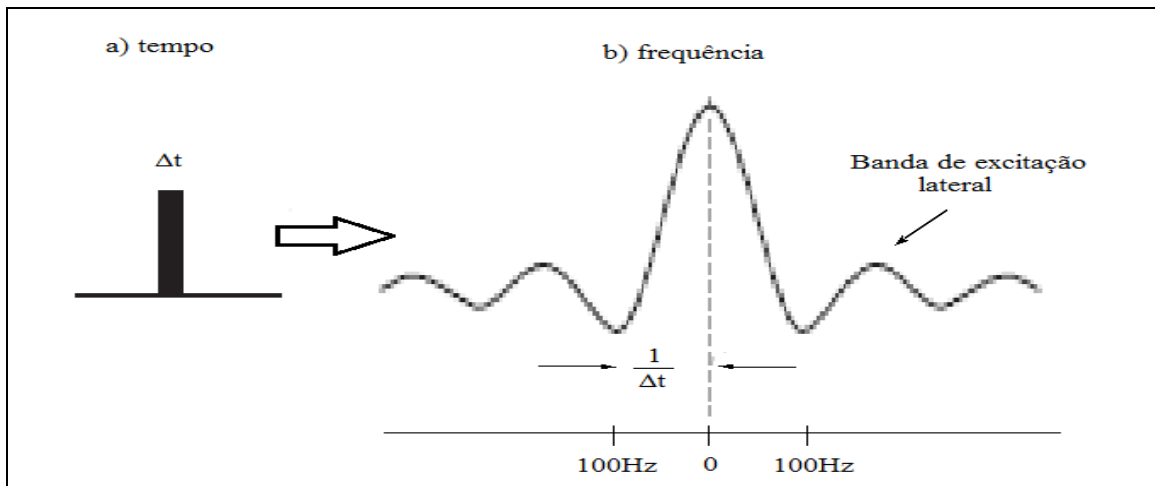


Figura 1.11 - a) Perfil no domínio do tempo do pulso duro calibrado; b) perfil de excitação no domínio de frequência.

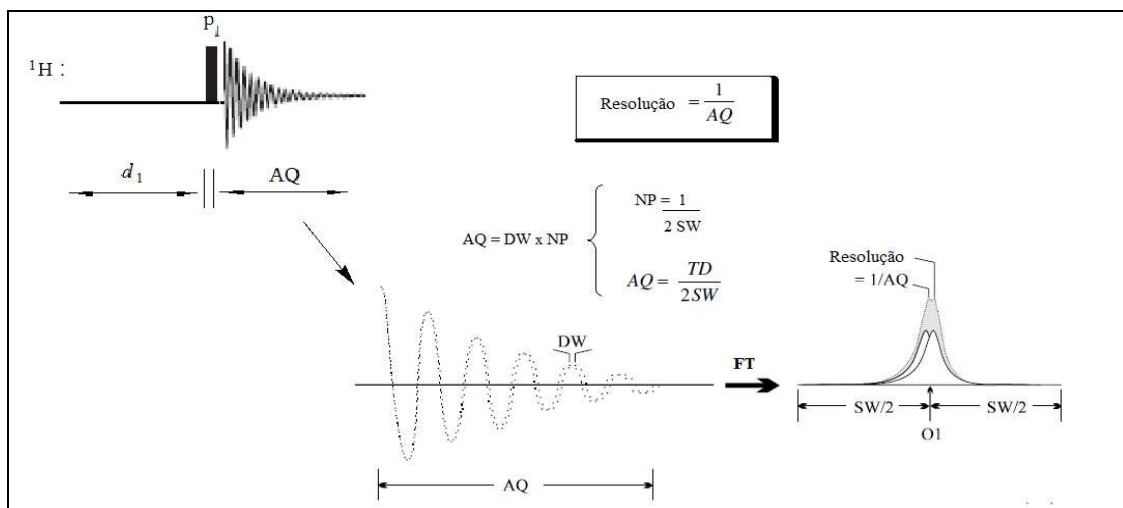


Figura 1.12 - Definição do tempo de aquisição no domínio de tempo e frequência.

Quanto mais tempo o sinal é amostrado, melhor a sua frequência pode ser definida e mais espaçados os sinais estarão no espectro final (Figura 1.13). Em geral, se quisermos distinguir duas linhas separadas por n Hz, o tempo de aquisição deve ser de pelo menos $1/n$ segundos (Holzgrabe, 2010).

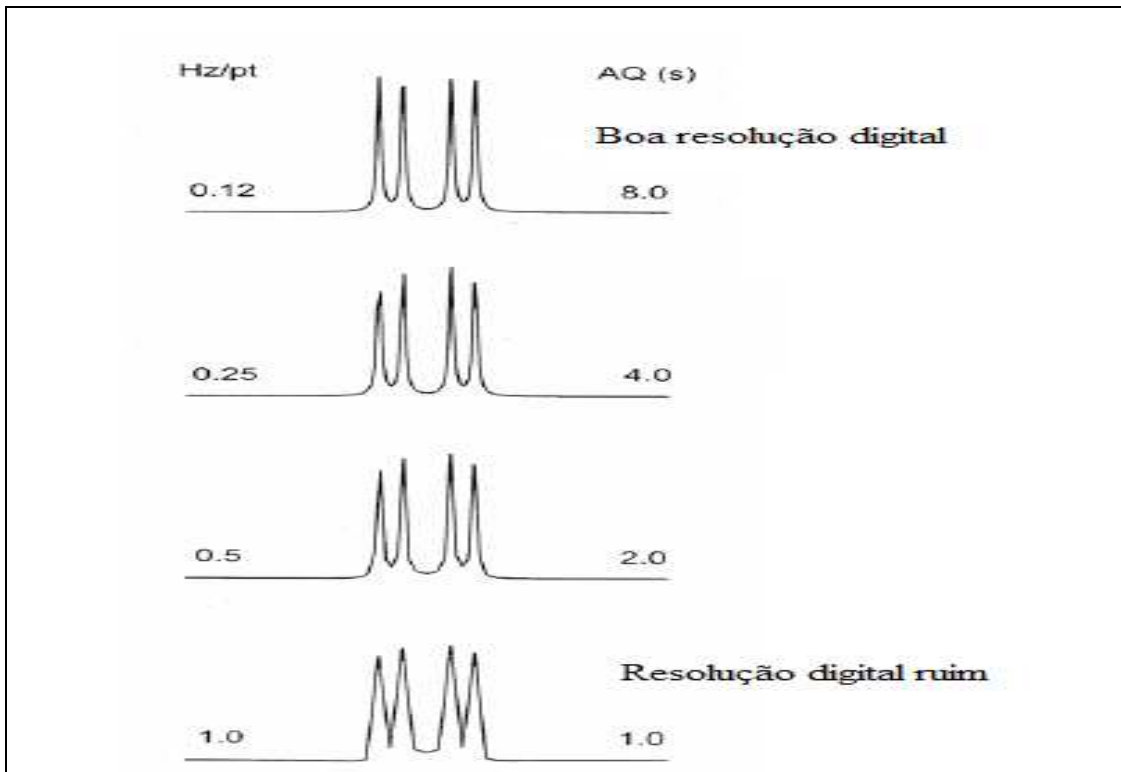


Figura 1.13 - Influência do tempo de aquisição na resolução digital no espectro.

- O tempo de espera - *delay* (d_1) (Figura 1.14a), o intervalo entre os pulsos, é de fundamental importância na aquisição dos espectros quantitativos e deve ser escolhido em função do valor do tempo de relaxação longitudinal (T_1) do hidrogênio mais longo dos sinais presentes na amostra (sinais da amostra a ser quantificada e padrão interno de comparação). O d_1 deve ser, no mínimo, cinco vezes o valor de T_1 , onde 99,3% da magnetização de equilíbrio (do sinal) é medido. Os valores de T_1 são determinados utilizando a sequência de pulso de inversão-recuperação (I.R.) (Figura 1.14b) (Holzgrabe, 2010).

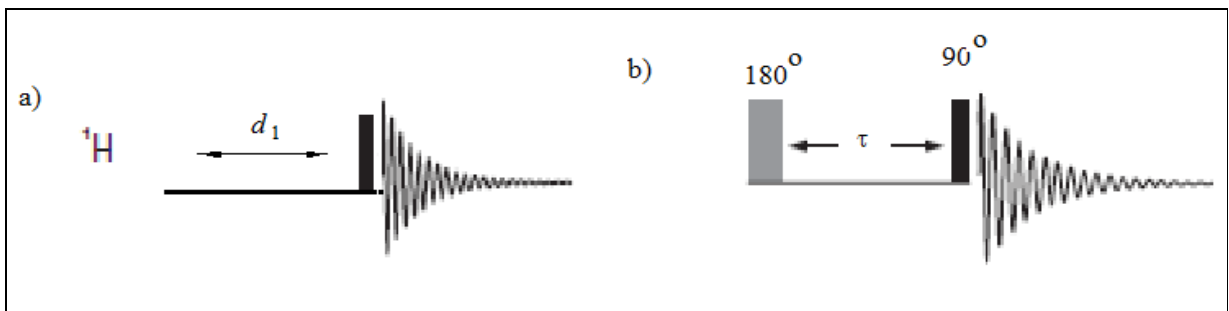


Figura 1.14 – a) Sequência de pulso para aquisição de RMN de ^1H ; b) Sequência inversão-recuperação para determinação dos valores de T_1 .

- Quanto maior o número de varreduras - *scans* (*ns*), maior é a razão sinal-ruído (*S/R*) (Figura 1.15). Entretanto, deve-se levar em consideração que a razão *S/R* é proporcional à raiz quadrada do número de *scans* (Equação 1.2) (Holzgrabe, 2010).

$$(S/R)_n = \sqrt{n}(S/R) \quad (1.2)$$

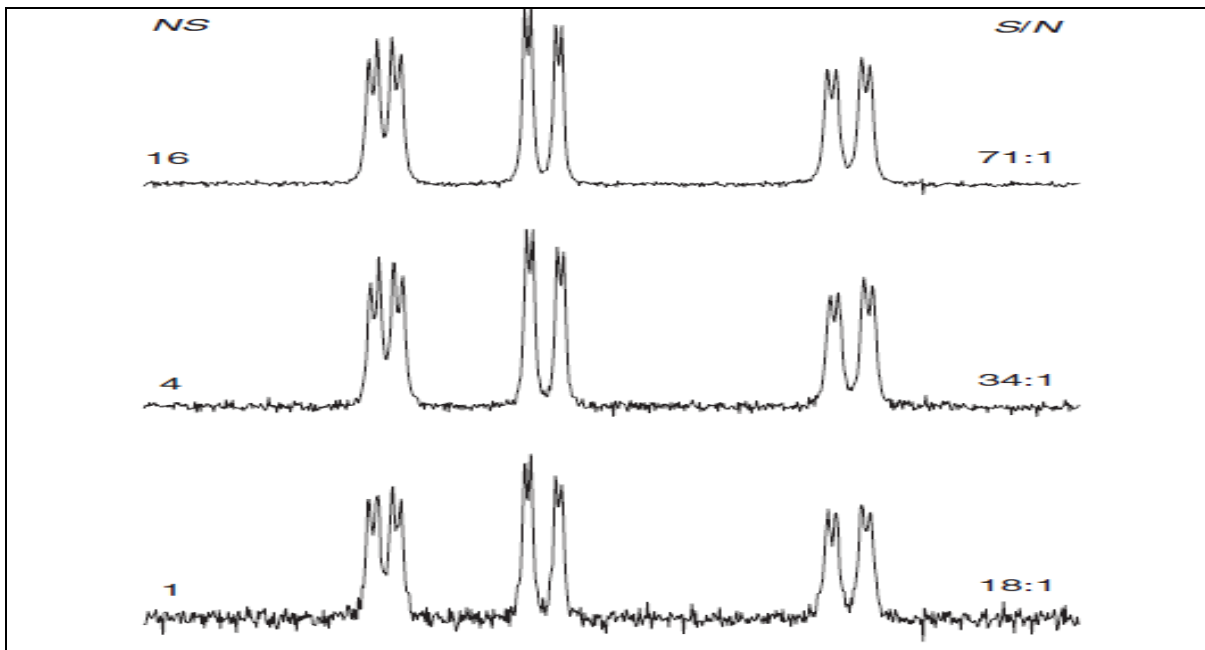


Figura 1.15 – A razão *S/R* aumenta com o aumento do número de *scans* (*ns*).

Pré-requisito 5) A precisão da integração da área de um sinal e a exatidão da quantificação depende da escolha de parâmetros de processamento apropriados do espectro (Holzgrabe et al., 2005; Soininen, 2008; Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012). Tais como:

- Função apodização: Existem várias maneiras pelas quais os FIDs adquiridos podem ser manipulados antes da FT para aumentar a sensibilidade e /ou a resolução da linha (Figura 1.16).

Normalmente se utiliza a função de apodização para melhorar a razão *S/R* do espectro (resolução do espectro) e revelar sinais próximos ao ruído, ou melhorar e revelar sinais com linhas muito finas que estão ocultos (constante de acoplamento muito pequena). Muitas funções de ponderação matemáticas, conhecidas como funções de apodização, têm sido propostas, algumas estão ilustradas na Figura 1.17.

- Preenchimento com zeros: a adição de pontos de dados igual a zero, aumenta a resolução digital, porém não deve exceder um fator dois.

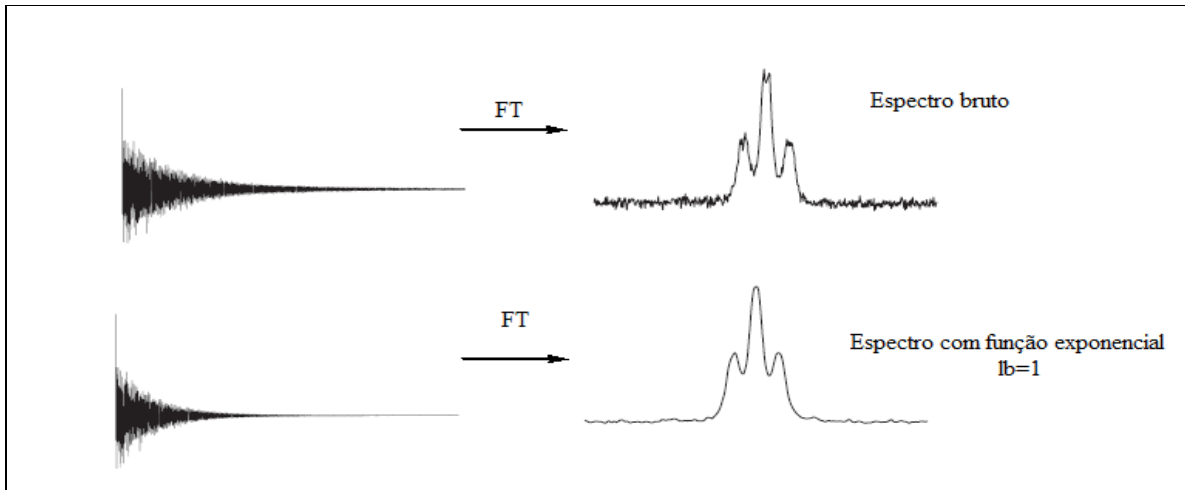


Figura 1.16 – Uso da função de apodização para melhorar a razão sinal ruído.

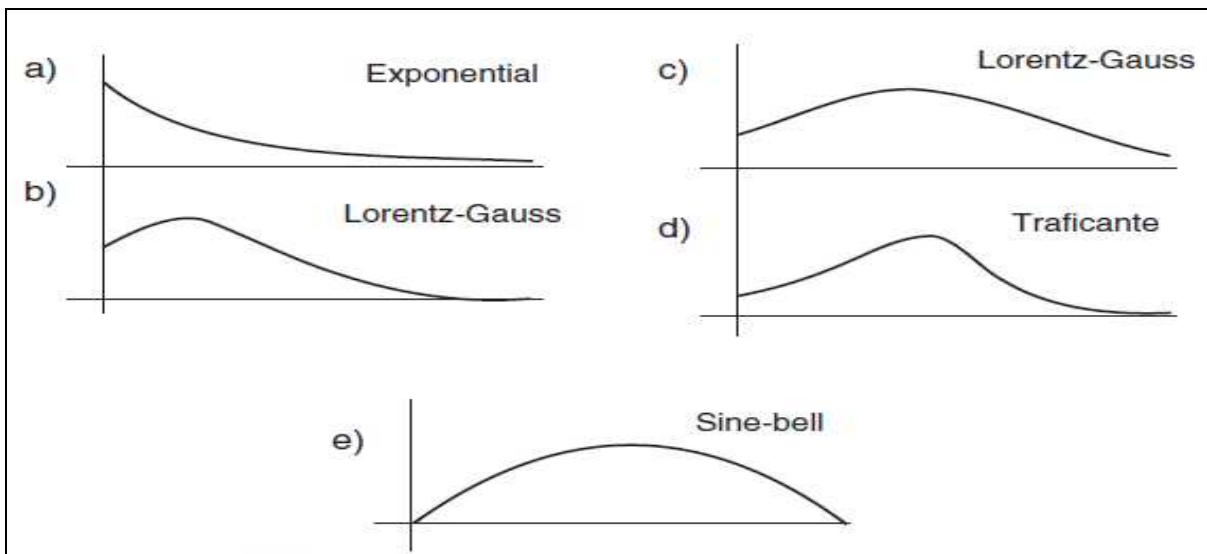


Figura 1.17 - Funções de apodização comumente empregadas.

- Correção da fase, linha de base e *drift* (*match* e *tunning*) devem ser aplicadas, a fim de produzir uma forma de linha adequada, além de alterar a intensidade dos sinais (Figura 1.18). Isso pode ser realizado automaticamente e/ou manualmente.

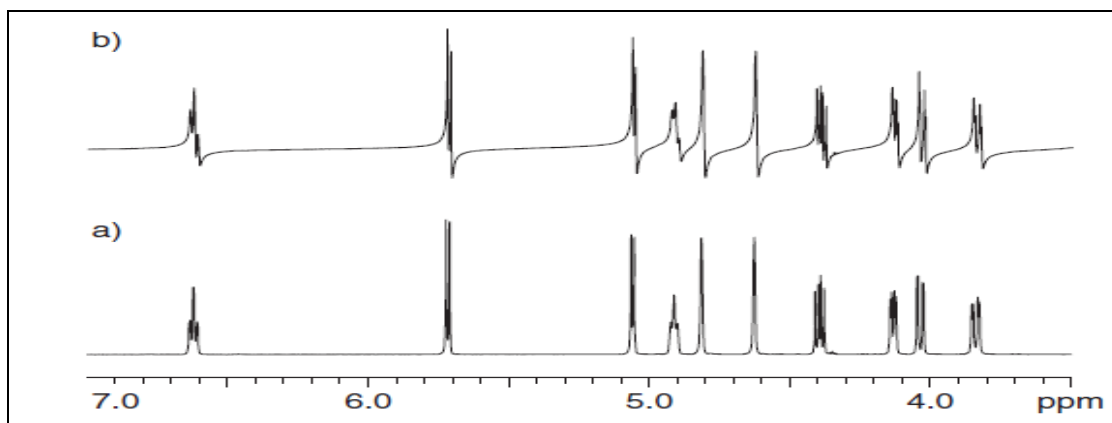


Figura 1.18- (a) espectro com correção da linha de fase (espectro em fase); (b) espectro sem correção da linha de base (espectro de ordem zero).

Além desses cinco pré-requisitos, que irão garantir um resultado preciso e exato, outras ações podem ser utilizadas para melhorar a sensibilidade e precisão da quantificação por RMN, tais como (Holzgrabe et al., 2005; Soininen, 2008; Holzgrabe, 2010; Bharti e Roy, 2012):

- Utilização de um espectrômetro com um campo alta intensidade (> 400MHz).
- Utilização de técnicas para garantir um *shimming* (homogeneização do campo magnético) ideal (Figura 1.19) aumenta a qualidade do espectro, pois garantem um campo magnético altamente homogêneo. Um campo magnético não-homogêneo cria sinais distorcidos e com formas inapropriadas, os quais resultam numa resolução pobre e uma baixa razão S/R do espectro. O ajuste do *shimming* pode ser feito de forma manual ou automática (Soininen, 2008).

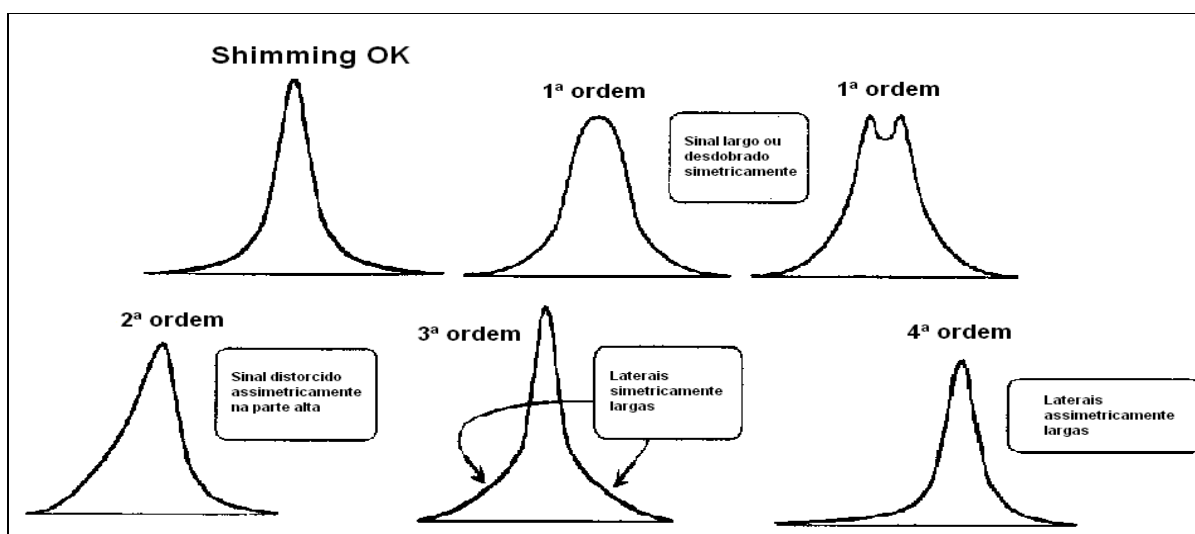


Figura 1.19- Exemplos de problemas comuns de *Shimming* (TSP- d_4 em D_2O).

- A utilização de crio sondas e sondas de detecção inversas aumentam a razão S/R de um fator > 10.

- Maximizar a concentração da amostra e minimizar a relação solvente/analito utilizando a tecnologia micromolar a nanomolar. O desenvolvimento e a utilização de sondas especiais melhoram substancialmente a razão S/R, além de oferecer a oportunidade de medir moléculas na faixa de concentração de nano ou picomolar (Holzgrabe et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, um importante pré-requisito para a quantificação em RMNq é a utilização de sinais claramente separados. Para obter-se uma separação de sinal ideal, algumas estratégias podem ser utilizadas (Holzgrabe et al., 2005; Holzgrabe, 2010):

- **Escolha do solvente:** O solvente conduz a mudanças consideráveis no deslocamento químico, levando a dispersão dos sinais e até alteração da constante de acoplamento e consequentes mudanças na multiplicidade do sinal. Assim, teoricamente a sobreposição de sinais pode ser resolvida com a simples mudança do solvente. Os solventes podem ser classificados como não-polar aromático e não-aromático, bem como polares próticos e apróticos (Quadro 1.3). Abraham et al. (2006) apresentaram os deslocamentos químicos de 124 compostos contendo diferentes grupos funcionais, utilizando DMSO- d_6 e $CDCl_3$ como solvente. Para os compostos próticos (aminas primárias e secundárias e álcoois) diferenças significativas no deslocamento químico foram encontradas quando comparados com compostos não-polares (alcanos) e polares apróticos (aminas terciárias e ésteres). A mudança do solvente é, então, uma opção útil e usual para resolver problemas de sobreposição de sinais. No entanto, a solubilidade da substância a ser analisada deve ser levada em consideração, pois para a RMNq, o analito deve estar completamente dissolvido. Assim, por vezes, a utilização de dois solventes deve ser aplicada para a separação dos sinais e a dissolução completa do analito (Holzgrabe, 2010).

Quadro 1.3- Solventes utilizados na RMN (Holzgrabe, 2010)

Solventes não-polar		Solventes polares	
aromáticos	Não-aromáticos	próticos	Apróticos
C_6D_6	$CDCl_3$	D_2O	DMSO- d_6
Tolueno- d_8	CD_2Cl_2	CD_3OD	Acetonitrila- d_3
Piridina- d_5	-	-	-

- **Concentração da amostra:** devido ao fenômeno de agregação, o deslocamento químico de hidrogênios e carbonos pode variar com a concentração da amostra, conforme exemplificado na Figura 1.20. Michaleas & Antoniadou Vyza (2008) ilustram como a alteração da concentração dispersa os sinais aromáticos e com isso ocorre a separação dos sinais dos hidrogênios H-5 e H-8 e a completa elucidação da estrutura. Entretanto, essa abordagem é limitada pela solubilidade dos compostos em um dado solvente (Holzgrabe, 2010).

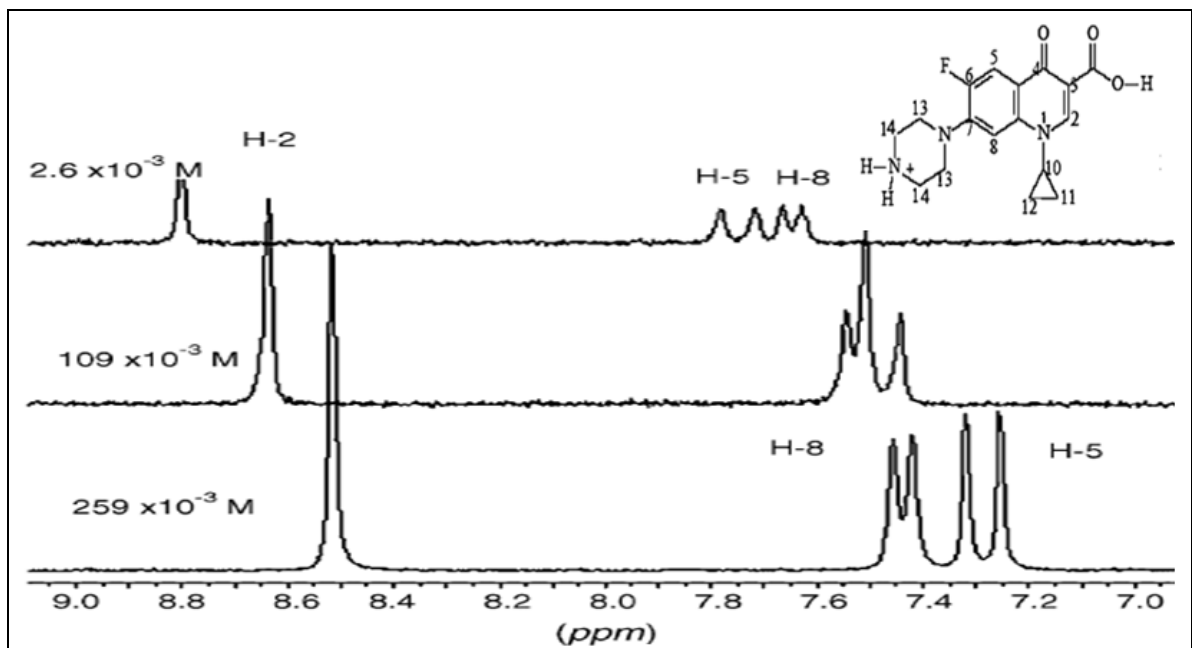


Figura 1.20 – Espectros de RMN de ^1H , em D_2O , de ciprofloxacina em diferentes concentrações. (a) concentração da amostra = $2,6 \times 10^{-3}\text{M}$; (b) concentração da amostra = $109 \times 10^{-3}\text{M}$ e (c) concentração da amostra = $259 \times 10^{-3}\text{M}$. (Michaleas & Antoniadou Vyza, 2008).

- **Temperatura:** O deslocamento químico também é bastante influenciado pelo efeito da temperatura. Na literatura existem diversos relatos principalmente associados aos grupos aminos e alcoois presentes na amostra. Dentro deste contexto o sinal oriundo da presença de água na amostra ou no solvente é um interferente que pode dificultar a elucidação estrutural e quantificação do teor de pureza. Esse problema pode ser resolvido com um estudo do efeito da temperatura, que produzirá variação do deslocamento químico do sinal da água (HOD). Essa estratégia pode ser exemplificada, pelo estudo realizado nos espectros de heparina não fracionada, em D_2O , em que o sinal da HOD está sobreposto aos sinais de interesse. Com o aumento da temperatura de 27°C para 80°C (Figura 1.21) o sinal da HOD foi deslocado em

aproximadamente 0,8 ppm facilitando a análise da região de interesse. Em muitos casos, este artifício pode melhorar a resolução do espectro (Beyer et al., 2008; Holzgrabe, 2010).

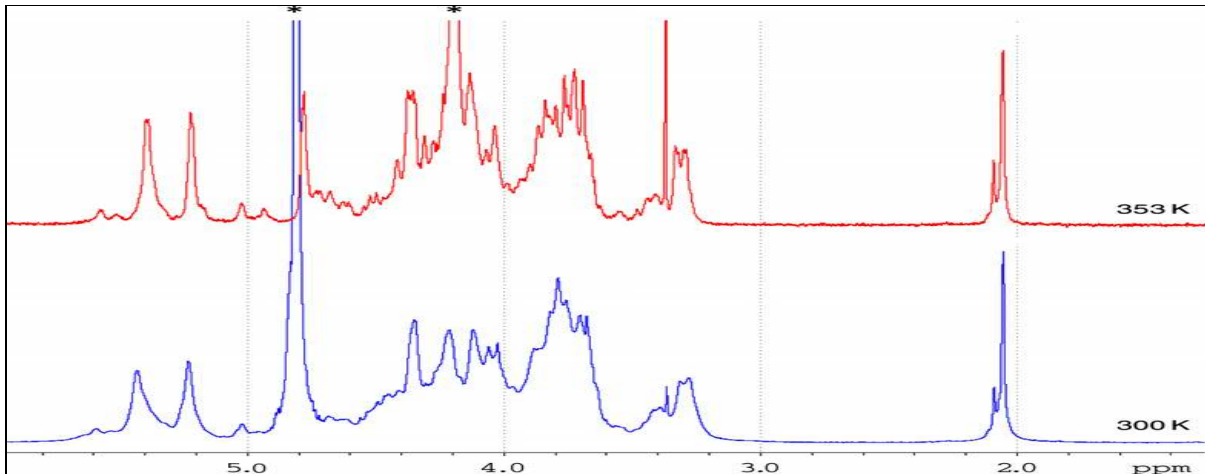


Figura 1.21 – Espectro de RMN de ^1H da heparina fracionada em D_2O (300MHz). O espectro em vermelho foi obtido numa temperatura de 353K e o espectro em azul a 300K. O sinal da HOD está apontando por um * (Beyer et al., 2008).

- **Valor de pH da solução:** Alterações significativas nos deslocamentos químicos podem ser induzidas através da variação do pH como no caso de protonação e desprotonação de grupos funcionais como aminas e ácido carboxílico, devido à introdução de cargas no sistema. Este efeito pode ser utilizado para obter a separação de sinais, como mostrado na Figura 1.22. No qual para determinação da qualidade do aminoácido alanina, que pode conter como impurezas potenciais (ácido aspártico, ácido glutâmico e ácido málico) na concentração até 1%. O aumento do pH, através da adição de NaOD, conduz a mudanças nos deslocamentos químicos das impurezas permitindo a identificação e quantificação das mesmas como observados na Figura 1.22a. Cabe ressaltar, que a presença de impurezas ácidas em diferentes quantidades também influenciam no pH da solução alterando os deslocamentos químicos dos componentes da mistura (Figura 1.22b). Uma vez que as mudanças no deslocamento químico podem ser alteradas pelo pH da solução, também pode-se obter informações a respeito do grau de desprotonação ou protonação e valores de pKa (Holzgrabe, 2010).

- **Reagentes auxiliares de deslocamento:** O solvente, propriamente dito, pode ser um agente de deslocamento como o caso de solventes aromáticos. Além deste tipo de solvente, certas

espécies paramagnéticas, como os íons lantanídeos (III), podem ser utilizadas como reagentes de deslocamento. Estes reagentes de deslocamento de íons de lantanídeo (LSR) são capazes de produzir variações relativamente grandes nos deslocamentos químicos, devido às propriedades físico-químicas. Na literatura existem vários exemplos, nos quais os LSR foram aplicados ao estudo de moléculas em solventes aquosos e orgânicos, utilizando complexos de Ln (III) do tipo acetilacetionato - Ln (dpm)₃, Ln (fod)₃ - que interagem com grupos funcionais como hidroxilas e aminas do analito. Também é importante mencionar a existência dos agentes orgânicos de solvatação quirais (CSA) que substituíram os LSR. A influência nos deslocamentos químicos causada por estes reagentes são dependente do meio, da temperatura e da concentração do complexo formado refletindo a constante de ligação com o analito (Holzgrabe, 2010).

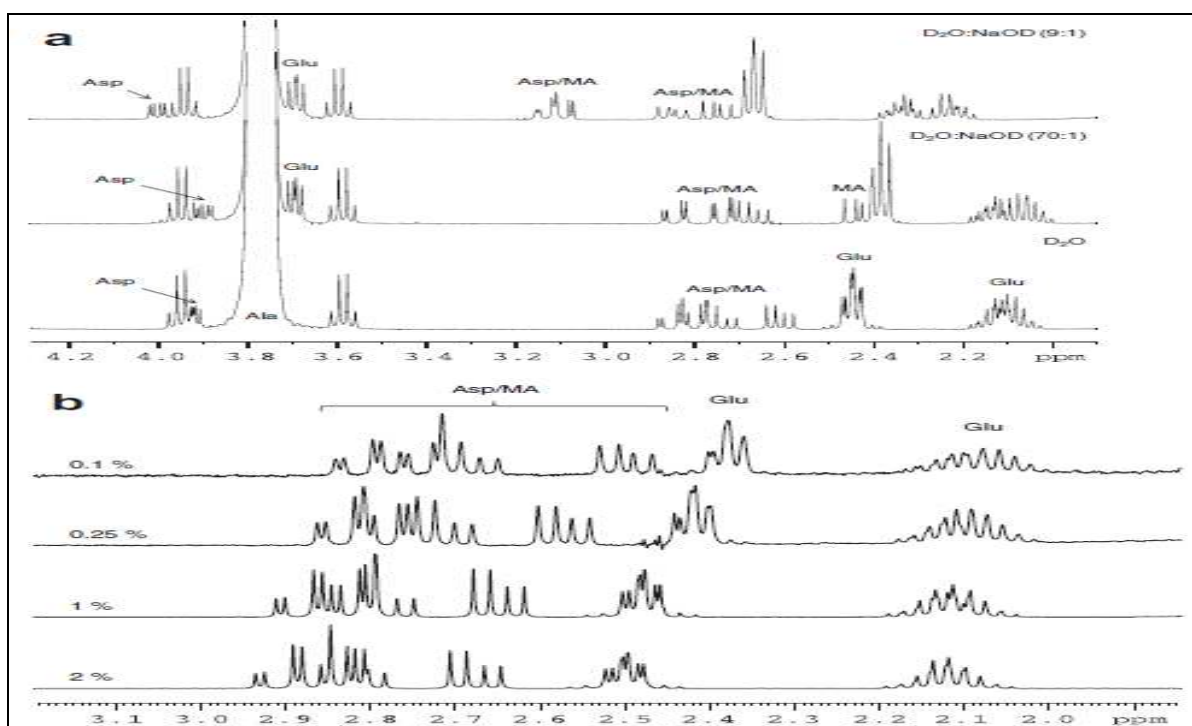


Figura 1.22- Espectros de RMN de ¹H de alanina, em D₂O, enriquecida com impurezas potenciais: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu) e ácido málico (MA). (a) dependente do pH, por meio da adição de NaOD. (b) com quantidades crescentes de impurezas (Holzgrabe, 2010).

1.8.1.1- Métodos para os cálculos quantitativos

Os cálculos utilizados na RMNq podem ser realizados por dois métodos diferentes: o método relativo e o método absoluto (Soinen, 2008; Holzgrabe, 2010; Santos e Colnago, 2013).

Método Relativo: A razão molar (n_x/n_y) entre dois componentes X e Y pode ser calculada pela razão entre a intensidade dos sinais (integral I) dos mesmos considerando o número de núcleos (N_x) de cada molécula que contribui para a geração dos sinais (Equação 1.3):

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x N_y}{I_y N_x} \quad (1.3)$$

Desde que K_{aq} seja constante, a mesma pode ser cancelada na Equação 1.1. Consequentemente, a quantidade de um composto X na mistura de m componentes é dada pela Equação 1.4:

$$\frac{n_x}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{I_x/N_x}{\sum_{i=1}^m I_i/N_i} 100\% \quad (1.4)$$

O método relativo é o método mais importante para quantificar as proporções de isômeros, como por exemplo, enantiômeros e diastereómeros, não sendo necessário o conhecimento dos pesos moleculares.

Método Absoluto: a RMNq possui dois diferentes métodos absolutos para análises quantitativas de conteúdo ou concentração:

a) Método chamado 100%, onde todas as impurezas, que aparecem no espectro de RMN são assinaladas, podendo ser medidas quantitativamente; o conteúdo é a diferença para o valor de 100%. Esse método não é aplicável para impurezas que não possuem núcleos observados no espectro de RMN, como por exemplo impurezas inorgânicas (NaCl ou gel de sílica).

b) A concentração do componente principal (P_x) pode ser calculado diretamente utilizando um padrão de concentração conhecida (P_c), conforme Equação 1.5. Analito e padrão devem ser dissolvidos no mesmo solvente.

$$P_x = \frac{I_x}{I_{Pc}} \frac{N_{Pc}}{N_x} \frac{M_x}{M_{Pc}} \frac{m_{Pc}}{m} \quad (1.5)$$

Onde:

I_x = valor da integral do sinal do analito

I_{Pc} = valor da integral do sinal do padrão

N_{Pc} = número de núcleos do padrão que gerou o sinal

N_x = número de núcleos do analito que gerou o sinal

M_x = peso molecular do analito

M_{Pc} = peso molecular do padrão

m_{Pc} = massa do padrão na amostra

m = massa do analito na amostra

Um grande número de possíveis padrões internos para RMNq de ^1H foram publicados nos últimos anos, e a sua utilização está condicionada à satisfação de três requisitos: (1) o padrão interno deve ser solúvel no solvente aplicado; (2) interação química e sobreposição com os sinais do analito devem ser evitada, sendo que o Pc deve apresentar, preferencialmente, apenas um único sinal como um simpleto; e (3) o T_1 , preferencialmente, deve estar próximo ou até mesmo menor que a amostra, pois o tempo de recuperação é determinado pelo T_1 mais longo da solução. Cabe ressaltar que o valor de T_1 depende do solvente utilizado (Holzgrabe, 2010).

No Quadro 1.4, estão listados padrões de referência para RMNq de ^1H utilizados em meio aquoso (D_2O) para polissacarídeos capsulares (Jones & Lemercinier, 2002; Malz & Jancke, 2005).

Quadro 1.4 – Lista de padrões de referência para qRMN de ^1H (Malz, 2008)

Padrões de referência para RMNq de ^1H		
Ácido 1,3,5-benzenotricarboxílico	Benzoato de benzila	Terc-butanol
1,3,5-trimetoxibenzeno	Bifenilo	Acetato de sódio
1,3,5-trioxano	Dimetilisofalato	TSP-d4
1,4-bis(TMS)-benzeno	dimetilformamida	Antracina
1,4-dinitrobenzeno	dimetilsufona	Ácido etacrínico
1,4-dioxano	Ácido fórmico	-
Ácido maléico	2,5-dimetilfurano	-

1.8.1.2- Exemplos da utilização da RMNq nas vacinas meningocócicas

A utilização da RMNq no controle de qualidade das vacinas meningocócicas tem sido descrito e utilizada por diversos autores. Jones & Lemerinier (2002) utilizaram a RMN para determinar quantitativamente o teor de grupamentos OAc nos polissacarídeos meningocócicos. A quantificação foi realizada comparando as intensidades dos sinais de resíduos de OAc do H-7 (7OAc) e H-8 (8OAc) com o sinal referente ao H-3_{eq} característicos do PSC.

Jódar et al. (2004) citaram a utilização da RMN no controle de qualidade e produção de vacinas meningocócicas conjugadas contra sorogrupo C como um método físico-químico moderno, capaz de caracterizar e quantificar o teor de grupamentos OAc do PSC com um grau de precisão maior do que os métodos clássicos.

No ano de 2005, Jones continuou utilizando a RMN para determinar o teor de grupamentos OAc nos polissacarídeos sorogrupos A, C, W135 e Y. Nesse caso foram obtidos dois espectros, primeiramente um espectro de amostras de polissacarídeos nativos e em seguida de polissacarídeos desacetilados. O teor de *O*-acetilação foi calculado a partir da integral do ânion acetato e um sinal característico do polissacarídeo desacetilado.

Em 2009, Borges realizou um estudo, como dissertação de mestrado, onde utilizou a RMNq com o objetivo de identificar e quantificar a pureza e teor de grupos OAc na molécula do polissacarídeo meningocócico sorogrupo A (PSA), além da umidade residual e o teor de etanol residual. Este método foi considerado adequado para utilização no controle de qualidade do PSA.

Vipond et al. (2012) utilizaram a RMNq, para avaliar uma amostra de PSC candidata à padrão internacional. O estudo foi realizado por quatro diferentes laboratórios, onde cada um utilizou seus próprios parâmetros de aquisição e padrão interno. A pureza do PSC foi calculada utilizando valores da integral de um sinal característico do PSC (H-3_{ax} e H-3_{eq}) e sinal do padrão interno.

Nesse mesmo ano (2012), Garrido e colaboradores desenvolveram um método, utilizando a RMNq, para avaliar quantitativamente o polissacarídeo meningocócico sorogrupo X (PSX). Os parâmetros de aquisição foram otimizados e os espectros foram obtidos utilizando uma sequência de pulsos GARP. O cálculo para determinação da pureza do PSX foi realizado através do método absoluto, utilizando o TSP- d_4 como padrão interno.

1.9- Validação de métodos analíticos

Para verificar se um método analítico está atendendo ao que se propõe o mesmo deve ser validado. Através da validação, pode-se demonstrar que o método analítico utilizado é apropriado para a finalidade pretendida e esteja totalmente sob domínio e controle, conforme exigido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Métodos não normalizados devem ser validados, como no caso da RMNq. Os parâmetros a serem avaliados no processo de validação estão publicados na resolução RE nº 899 – Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos, da ANVISA e no documento DOQ-CGCRE-088 – Orientação sobre validação de métodos analíticos, do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e são apresentados a seguir (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010; Santos e Colnago, 2013).

Precisão - É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. No caso da RMNq, um resultado válido está associado à uma precisão do processo de integração. Essa precisão depende da razão S/R dos sinais de interesses utilizados na quantificação, ou seja, é necessária uma máxima razão S/R para uma integração precisa (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010).

Exatidão – É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro convencional (VVC). A exatidão de um método de RMNq está relacionada com a direta proporcionalidade entre a intensidade do sinal e a quantidade de núcleos que geraram esse sinal. Para tal, um padrão deve ser utilizado como uma referência no ensaio, como por exemplo, o TSP- d_4 (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010).

Especificidade e Seletividade – Ambos os parâmetros estão relacionados com detecção. O método é dito específico quando é capaz de produzir resposta para apenas um analito. E um método seletivo é capaz de produzir respostas para vários analitos, mas distinguindo a resposta de um analito para o outro. A seletividade e a especificidade, na RMNq, está relacionada com a

pureza do sinal utilizado para a quantificação. Esse sinal deve ser atribuído a um dos grupos da substância a ser analisada, devendo ser assegurado que possui apenas núcleos da mesma. Para verificar a especificidade e seletividade na RMNq, podemos utilizar algumas estratégias ou ferramentas (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010; Santos e Colnago, 2013):

- utilização de equipamentos com campos magnéticos mais elevados, com isso seria capaz de aumentar a sensibilidade e dispersão dos sinais no espectro obtido;
- avaliação de espectros obtidos de outros núcleos (por exemplo, ^{13}C), obtendo mais detalhes da estrutura analisada;
- avaliação de espectros obtidos do solvente utilizado, do padrão interno, da substância de referência e da amostra, com o objetivo de verificar possíveis sobreposições de sinais;
- utilização de RMN bidimensional, como por exemplo, *Diffusion-ordered spectroscopy* (DOSY), podendo ser observada a correlação dos sinais de impurezas ocultas nos espectros unidimensionais.

Linearidade – É a sua capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, na faixa de concentração conforme a aplicação pretendida. A RMNq, por si próprio já é considerada um método linear. Isso se deve ao fato, novamente, da direta proporcionalidade entre a intensidade do sinal e a quantidade dos núcleos que geraram o sinal (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010; Santos e Colnago, 2013).

Intervalo – É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010).

Robustez – É a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. A robustez da RMNq pode ser verificada em todos os parâmetros importantes da aquisição e processamento de dados e da avaliação do espectro de RMN (integração). Devido a isso, é necessária a adoção de um conjunto de parâmetros otimizados em função da amostra para uma precisa aquisição de dados, caso contrário, podem ocorrer erros de medição. Mudanças nestes parâmetros de aquisição

influenciam significativamente na razão S/R e na correta intensidade do sinal (ANVISA, 2003; Malz & Jancke, 2005; INMETRO, 2010).

Limite de detecção – É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

Limite de quantificação – É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

1.10- Justificativa do trabalho

Com a mudança do local de produção dos polissacarídeos meningocócicos, utilizados na produção de Bio-Manguinhos, a ANVISA, seguindo a RDC nº 55, 16/12/2010, está exigindo que se comprove a identidade dos polissacarídeos produzidos nesse novo local. Até o presente momento, Bio-Manguinhos só tem utilizado a técnica de RMN de ^1H na comparação do perfil do espectro. As análises realizadas para essa finalidade apenas permitem a visualização de grupos funcionais que caracterizam os polissacarídeos meningocócicos e a presença de algumas impurezas, não sendo possível a quantificação dos mesmos. A pureza e o teor de *O*-acetilação dos polissacarídeos são realizados utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis. A técnica é reconhecidamente confiável, porém requer etapas de preparo de amostras e curva de calibração com padrão idêntico ao analito envolvendo um grande número de manipulação, que se negligenciadas quanto ao parâmetro metrológico, podem impactar negativamente nos resultados, além de acarretar uma alta variação em torno dos resultados encontrados. A aplicação da espectroscopia de RMN quantitativa é dada como uma ferramenta poderosa, capaz de minimizar tais problemas encontrados na técnica de espectrofotometria UV-Vis, possibilitando uma redução considerável no quantitativo de amostra (em torno de 7 mg) e tempo de análise empregado no controle de qualidade dos polissacarídeos. É capaz de realizar simultaneamente a identificação e quantificação dos polissacarídeos. Além disso, para a realização da análise não há necessidade de construção de curva de calibração, bem como a utilização de padrões idênticos ao analito, já que se trata de um método primário (Borges, 2009; Vipond et al., 2012; Santos e Colnago, 2013).

2- OBJETIVO

2.1- Geral

Desenvolver uma metodologia por RMN que permita verificar a identidade e a quantificação dos polissacarídeos meningocócicos C e W135, de preferência em um único experimento.

2.2- Específicos

- Avaliar a identidade dos PSC e PSW135 através da RMN de ^1H .
- Otimizar o conjunto de parâmetros a serem utilizados na metodologia de RMNq de ^1H para a quantificação dos polissacarídeos.
- Adaptar o método de EC, utilizado no controle de qualidade das vacinas meningocócicas polissacarídicas, para determinar a pureza do PSW135.
- Realizar uma comparação dos resultados obtidos pela metodologia de RMN de ^1H com os resultados obtidos pela metodologia de espectroscopia UV-Vis e EC.
- Realizar estudo de pré- validação do conjunto de parâmetros adotados para a metodologia de RMNq.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Todos os lotes de polissacarídeo utilizados na elaboração desse trabalho foram produzidos no Instituto Finlay (Cuba), aprovados pelo Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos e utilizados na formulação da vacina meningocócica trivalente ACW. Estes lotes foram produzidos e purificados utilizando uma metodologia de precipitação alcoólica descrita por Gotschlich et al. (1969).

Para a verificação da identidade dos polissacarídeos, foram utilizados dois lotes de cada sorogrupo: PSC (IMC0011 e IMC0013) e PSW135 (IMW0003 e IMW0006). Para a otimização dos parâmetros de aquisição do método de RMNq de ^1H , foi utilizado um lote de cada sorogrupo: PSC (IMC0011) e PSW135 (IMW0003). Para a avaliação do método de RMNq de ^1H , desenvolvido neste trabalho, foi calculado o número mínimo de amostras necessárias segundo a Equação 3.1, originada do Teorema Central (Bussab & Morettin, 2002).

$$n = \left(\frac{1,96 \times CV}{\text{erro aceitável}} \right)^2 \quad (3.1)$$

Onde:

n = número de amostras

CV = coeficiente de variação

Um estudo preliminar utilizando a técnica de RMN de ^1H para a quantificação da pureza, do grupo OAc e das impurezas na molécula de polissacarídeo meningocócico sorogrupo A, encontrou um CV de 1,18% (Borges, 2009). Baseado neste valor, o CV utilizado para o cálculo do n amostral foi de 2%, por se tratar de um erro aceitável. Esse valor ao ser utilizado na Equação 3.1 resultou em um n igual a quatro. Desta forma, foram utilizados quatro lotes de polissacarídeo PSC (IMC0011, IMC0013, IMC0018 e IMC1001) e PSW135 (IMW0003, IMW0006, DF-007W

e DF-008W). Para o estudo de adaptação do método de EC foram utilizados quatro lotes de PSW135 (IMW0003, IMW0006, DF-007W e DF-008W). Finalmente para os estudos de pré-validação do método de RMNq de ^1H foi utilizado um lote de PSW135 (PSW009).

3.1 – Experimentos por RMN de ^1H

3.1.1- Preparo das amostras e padrões

Estudos prévios do efeito da concentração na resolução dos sinais dos polissacarídeos mostraram que para a obtenção de espectros de RMN de ^1H o ideal é uma concentração de 7mg/ml. As amostras foram secas, até peso constante à temperatura de 60°C, numa balança termogravimétrica Sartorius MA100H, e em seguida dissolvidas em 0,7mL de água deuterada pura (Cambridge Isotope Laboratories, Inc), contendo 1% de TSP- d_4 . Os padrões de ácido N-acetil neuramínico (Sigma Aldrich) e galactose (USP Reference Standard) foram pesados em balança analítica Mettler Toledo XS205 Dual Range e dissolvidas em água deuterada contendo 0,01% de DSS (Cambridge Isotope Laboratories, Inc), para a obtenção de espectros qualitativos utilizados na avaliação da identidade das moléculas em estudo. No estudo dos parâmetros de pré-validação do método, o padrão de NANA foi dissolvido em água deuterada contendo 1% de TSP- d_4 .

3.1.2- Condições experimentais

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX 400 (400MHz) e Avance 500 (500MHz para ^1H) utilizando uma sonda *broadband* (BB) de 5 mm à 40,0±0,1°C, e um pulso de 30°. A avaliação da identidade dos polissacarídeos e a otimização dos parâmetros quantitativos foram realizadas no espectrômetro de 400MHz, enquanto os experimentos quantitativos foram realizados no espectrômetro de 500MHz. Os valores dos deslocamentos químicos (δ) foram referidos em ppm e as multiplicidades descritas como: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd) e multiplete (m).

Os parâmetros de aquisição para os espectros qualitativos de hidrogênio, para ambos os polissacarídeos e padrões de NANA e galactose, foram: ns= 32; d1= 1s e T= 313K. Já para os espectros quantitativos, os parâmetros foram otimizados conforme descrito a seguir.

Para determinar o T_1 foi utilizada a sequência de pulsos inversão-recuperação ($180^\circ - \tau - 90^\circ$). As medidas foram obtidas usando τ que variam entre 0,0125 e 6,4 segundos para o PSC e 0,4 e 13 segundos para o PSW135. O maior valor de T_1 encontrado foi utilizado para determinar o tempo de espera (d_1), que deve ser cinco vezes o T_1 ($d_1 = 5 \times T_1$). Os parâmetros de aquisição (número de varredura - ns; temperatura - T, janela espectral - SW) foram otimizados e selecionados em função do valor da razão S/R, que deve ser maior que 250. O número de varredura foi avaliado na faixa de 32 a 128 scans; a temperatura entre 308 e 323K; e a janela espectral foi determinada adicionando 3ppm ao final de cada lado do espectro, a largura de linha (lb) utilizada foi igual a 0,3. Os experimentos de RMNq de ^1H foram adquiridos sem rotação da amostra, utilizando as sequências zg e zgig, que correspondem aos experimentos de hidrogênio tradicional e ao GARP, respectivamente.

3.1.3- Processamento dos dados

Todos os espectros foram processados no software MESTRENOVA 6.0 e no TopSpin 2.1.

Os cálculos para a quantificação dos polissacarídeos foram realizados em planilha eletrônica Excel, utilizando o método absoluto de cálculo, conforme Equação 3.2 (Soininen, 2008; Holzgrabe, 2010; Santos e Colnago, 2013).

$$C_x = \frac{I_x}{q_x \text{ } ^1\text{H}} \cdot \frac{C_{pad} \cdot q_{pad} \text{ } ^1\text{H}}{I_{pad}} \quad (3.2)$$

Onde:

C_x = Concentração em mol/L do analito a quantificar;

I_x = Valor de integral do sinal correspondente ao(s) H^1 ligado(s) ao grupo a quantificar ou presentes no analito a quantificar;

$q_x \text{ } ^1\text{H}$ = Quantidade de ^1H correspondente ao sinal avaliado;

C_{pad} = Concentração em mol/L do padrão;

$q_{pad}^1\text{H}$ = Quantidade de ^1H correspondente ao sinal do padrão;

I_{pad} = Valor de integral do sinal correspondente ao(s) ^1H presente(s) no padrão.

A Equação (3.2) foi estabelecida, baseando-se na existência de uma relação direta entre as integrais dos sinais do padrão (TSP- d_4) e do analito (x), com a quantidade de núcleos que deram origem ao sinal.

Portanto, o procedimento para realização do cálculo de percentual de pureza e teor de grupos OAc para o PSC e percentual de pureza para o PSW135 foi realizado da seguinte forma:

- PSC

Após a obtenção do espectro quantitativo, os sinais de interesse foram integrados, sempre iniciando a integração pelo sinal do TSP- d_4 , que recebe um valor de integral igual a 1,0000 (Figura 3.1 e Tabela 3.1).

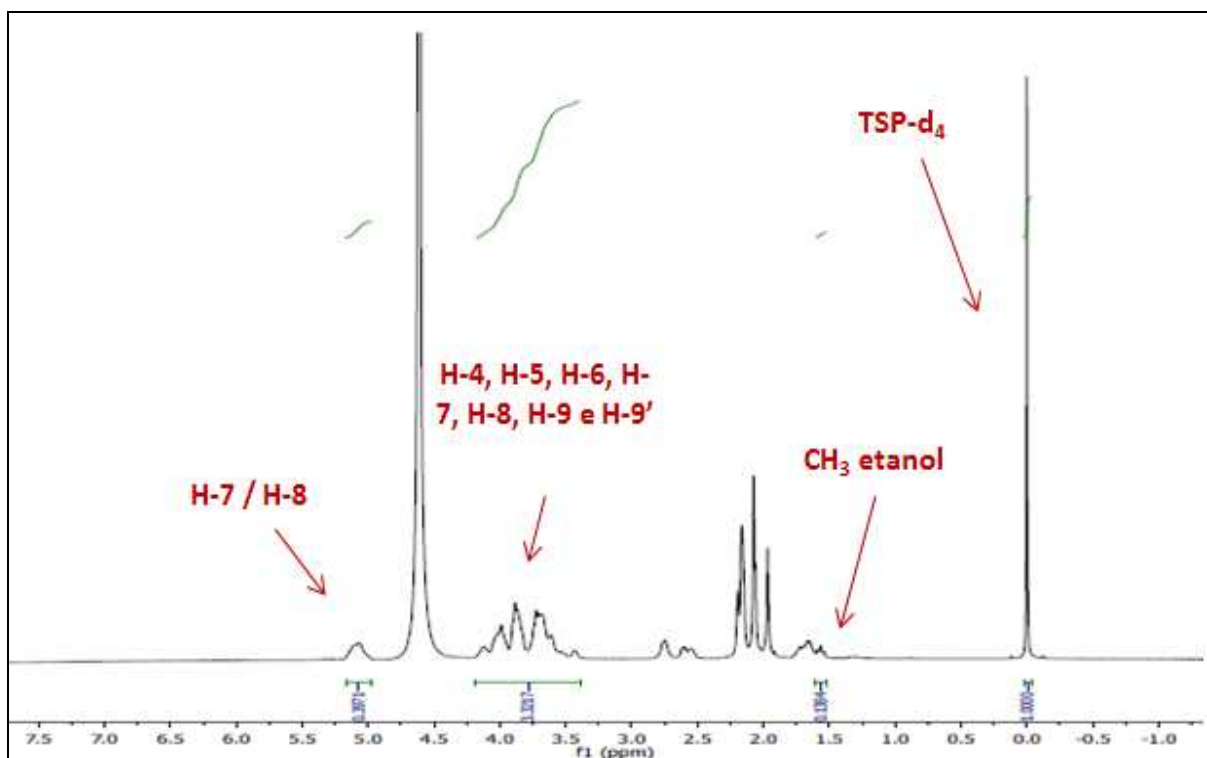


Figura 3.1 – Espectro de RMN de ^1H , 500MHz, do PSC em D2O com os sinais de interesse para quantificação integrados.

Tabela 3.1- Valores de integral utilizados no cálculo de percentual de pureza e teor de OAc do PSC.

Sinal	Deslocamento Químico (ppm)	Quantidade de hidrogênio	Valor da integral
1	H-7/H-8	1	0,3971
2	H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-9'	7	3,3217
3	CH ₂ do etanol	2	0,1384
4	TSP-d ₄	9	1,0000

Como o PSC utiliza dois sinais para a quantificação do percentual de pureza, o valor da integral de ambos são somados e subtraídos do valor da integral do CH₂ do etanol, uma impureza que apresenta seu sinal sobreposto com os sinais da região do multiplete (3,30 a 4,20ppm), conforme Equação 3.3.

$$\text{Integral total} = \text{sinal 1} + \text{sinal 2} - (\text{sinal 3} \times 2/3) \quad (3.3)$$

O valor da integral total encontrado foi, então utilizado no cálculo do percentual de pureza do PSC, conforme Equação 3.4.

$$\frac{\text{Massa TSP-}d_4 \text{ (mg)} \times \text{Integral total} \times \text{quantidade } ^1\text{H do sinal TSP-}d_4 \times \text{Peso Molecular PSC} \times 100}{\text{Integral TSP-}d_4 \times \text{quantidade } ^1\text{H dos sinais PSC} \times \text{Peso Molecular TSP-}d_4 \times \text{Massa PSC (mg)}} \quad (3.4)$$

Para o cálculo do teor de grupos OAc, foi utilizado apenas o valor da integral do sinal referente ao H-7/H-8 (sinal 1), conforme Equação 3.5.

$$\frac{\text{Massa TSP-}d_4 \text{ (mg)} \times \text{Integral sinal 1} \times \text{quantidade } ^1\text{H do sinal TSP-}d_4}{\text{Integral TSP-}d_4 \times \text{quantidade } ^1\text{H do sinal PSC}} \quad (3.5)$$

- PSW135

Os sinais de interesse foram integrados, também iniciando-se a integração pelo sinal do TSP- d_4 (Figura 3.2 e Tabela 3.2).

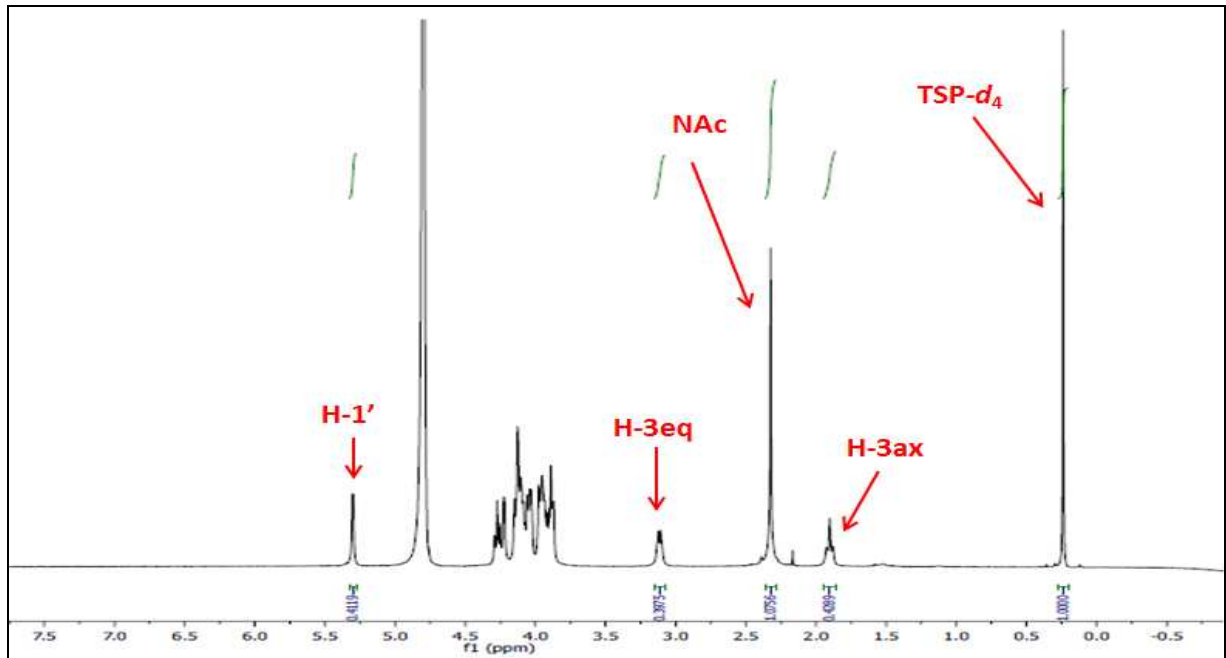


Figura 3.2 – Espectro de RMN de ^1H , 500MHz, do PSW135 em D_2O com os sinais de interesse para quantificação integrados.

Tabela 3.2- Valores de integral utilizados no cálculo de percentual de pureza do PSW135.

	Sinal	Deslocamento Químico (ppm)	Quantidade de hidrogênio	Valor da integral
1	H-1'	5,10	1	0,4119
2	H-3eq	2,88	1	0,3975
3	NAc	2,10	3	1,0756
4	H-3ax	1,67	1	0,4289
5	TSP- d_4	0,0	9	1,0000

O valor da integral do sinal foi utilizado no cálculo do percentual de pureza do PSW135, conforme Equação 3.6.

$$\frac{\text{Massa TSP-}d_4 \text{ (mg)} \times \text{Integral sinal PSW} \times \text{quantidade } ^1\text{H do sinal TSP-}d_4 \times \text{Peso Molecular PSW} \times 100}{\text{Integral TSP-}d_4 \times \text{quantidade } ^1\text{H do sinal PSW} \times \text{Peso Molecular TSP-}d_4 \times \text{Massa PSW (mg)}} \quad (3.6)$$

3.2- Experimentos por espectrofotometria UV-Vis

Os resultados de pureza e teor de OAc apresentados neste trabalho foram os resultados encontrados durante as análises de controle de qualidade dos lotes de polissacarídeos meningocócicos.

As análises de espectrofotometria UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Beckman Coulter DU730 e os dados obtidos plotados em planilha Excel, utilizando uma curva de regressão linear ($y = ax - b$).

A determinação da concentração de ácido siálico foi realizada pelo método de Svennerholm (1957), seguindo o procedimento estabelecido no documento interno LAFIQ – IT 0717 (Bio-Manguinhos, 2010), baseado na Farmacopéia Européia (2005) e nos requerimentos da OMS (WHO, 1976; WHO, 1978; WHO, 1981).

O método baseia-se na reação do ácido siálico presente na amostra com a mistura de resorcinol e sulfato de cobre, formando um complexo de coloração azul, que varia sua intensidade dependendo da concentração de ácido siálico.

A determinação do teor de *O*-acetil foi realizada pelo método de Hestrin (1949), seguindo o procedimento estabelecido no documento interno LAFIQ – IT 1585 (Bio-Manguinhos, 2011), baseado na Farmacopéia Européia (2005) e nos requerimentos da OMS (WHO, 1976; WHO, 1978; WHO, 1981).

O método baseia-se na formação de um complexo entre o OAc e o íon ferro III, de coloração que varia do amarelo ao marrom, dependendo da concentração de *O*-acetil.

A cepa utilizada na produção de PSW135 gera polissacarídeos desacetilados, conforme comprovado através de um estudo realizado anteriormente por Bio-Manguinhos, utilizando o método de Hestrin e a RMN de ^1H (para fins de caracterização). Devido a este fato, não é realizado teste de determinação do teor de OAc no PSW135, pelo método de Hestrin.

3.3- Experimentos por EC

3.3.1- Preparo das amostras, padrões e curva de calibração

As amostras foram secas, até peso constante, e pesadas ($\pm 7\text{mg}$) numa balança termogravimétrica Sartorius MA100H à 60°C. Após isso foram dissolvidas em água Milli-Q,

utilizando um balão volumétrico de 20mL. A partir dessa solução, as amostras foram diluídas, em tampão comercial borato 20mM pH 9,3 (Agilent Technologies), a fim de se obter uma concentração de 250µg/mL. Uma solução de trabalho, contendo 500µg/mL de padrão *in house* de PSW135 (Finlay), foi utilizada para o preparo da curva de calibração. A curva foi construída com cinco pontos em diferentes concentrações (150, 200, 250, 300, e 350µg/mL). Foram preparadas três soluções utilizando os padrões de NANA e galactose dissolvidos em tampão borato pH 9,3, obtendo-se três soluções de concentração igual a 500µg/mL. A primeira solução foi preparada utilizando somente o padrão de NANA, a segunda utilizando o padrão de galactose e a terceira utilizando uma mistura de ambos.

3.3.2- Condições experimentais

Os experimentos de EC foram realizados em um equipamento Agilent CE7100, através da técnica de CZE, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 50µm, comprimento longitudinal efetivo de 29,5cm e comprimento longitudinal total de 38cm (Agilent) e um detector UV/DAD com monitoramento de 200nm de comprimento de onda. O capilar virgem foi condicionado com um fluxo de NaOH 1M por dez minutos, espera de cinco minutos, água Milli-Q por dez minutos e tampão de corrida borato 20mM pH 9,3 (Agilent Technologies) por trinta minutos. Entre as análises foi realizado um pré-condicionamento do capilar utilizando tampão de corrida borato 20mM, com variação de tempo de 1 a 10 minutos; e um pós-condicionamento utilizando uma solução de NaOH 0,1M e água Milli-Q no intervalo de tempo de 1 a 10 minutos entre cada injeção. Os experimentos seguiram as seguintes condições de análise: voltagem de 10KV, potência de 0,5W, corrente na faixa de 40-60 µA, cassete mantido a 25°C e uma introdução hidrodinâmica das amostras a 50mbar por 5 segundos. Os parâmetros de análise seguiram os procedimentos descritos no documento interno LAFIQ – IT 6012 (Bio-Manguinhos, 2011), que descreve a análise de determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina meningocócica ACW polissacarídica, baseados em Lamb et al. (2005). A diferença entre o procedimento descrito em tal documento e o realizado neste trabalho consistiu na alteração do tampão de análise e tempo de corrida utilizado, para adequação das condições de análise para quantificação do PSW135.

3.3.3- Processamento dos dados

Os dados obtidos foram plotados em planilha Excel, construindo-se uma curva de regressão linear ($y = ax - b$), utilizando as áreas normalizadas (área do pico/tempo de migração; Altria, 1999).

3.4- Estudos de pré-validação do método de RMNq

Os estudos de pré-validação do método de RMN desenvolvidos durante este estudo seguiu as normas estabelecidas na Resolução – RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos).

O método tem como finalidade a quantificação de princípio ativo em produtos farmacêuticos e de acordo com a norma da ANVISA, é classificado como método de Categoria I, devendo avaliar os seguintes parâmetros durante a validação: especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez, conforme descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.3- Ensaio necessários para a validação do método analítico (ANVISA, 2003).

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

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste.

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

Esses parâmetros foram avaliados utilizando um lote de PSW135 (PSW 009) e padrão de NANA (Sigma Aldrich).

A especificidade/seletividade foi avaliada através da análise de espectros obtidos, separadamente, do branco, do padrão interno e da substância de referência (NANA).

A linearidade foi avaliada através da análise de cinco diferentes concentrações de uma solução padrão de NANA, cujas concentrações estão compreendidas entre 4,29mg/mL e 10,0mg/mL.

O intervalo do método foi avaliado de acordo com os critérios de aceitação para linearidade, exatidão e precisão.

Para os métodos com finalidade de quantificação da substância ativa são exigidos a avaliação da repetitividade e da precisão intermediária (ANVISA, 2003). A repetitividade foi avaliada através de seis determinações a 100% da concentração do teste. A precisão intermediária foi avaliada através de seis determinações a 100% da concentração do teste, por dois analistas diferentes em dois dias diferentes.

A exatidão foi avaliada através da análise de uma substância de pureza conhecida (NANA), a partir de nove determinações, contemplando o intervalo linear, ou seja, utilizando três concentrações diferentes (baixa – 4,29mg/mL, média – 7,14mg/mL e alta – 10,0mg/mL) e calculada conforme Equação 3.4.

$$Exatidão (\%) = \frac{Pureza\ média\ experimental}{Pureza\ teórica} \times 100 \quad (3.4)$$

A robustez foi avaliada através da variação da temperatura (303 a 323K) e número de *scans* (32 a 128) no momento da aquisição do espectro.

3.5- Avaliação e comparação estatística dos métodos UV-Vis, RMNq e EC

Para a realização da avaliação e comparação estatística dos métodos UV-Vis, RMN e EC foram utilizados gráficos de erros construídos utilizando as médias globais dos resultados obtidos e um nível de confiança de 95%, além da análise de variância (ANOVA), com o mesmo nível de confiança. Esses gráficos foram construídos utilizando o *software R* (Core Team, 2012).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi dividido em cinco etapas, onde a primeira etapa consistiu na caracterização da identidade dos polissacarídeos PSC e PSW135 utilizando análise qualitativa de RMN de ^1H . Na segunda etapa foram determinados os parâmetros de aquisição dos espectros quantitativos de RMN de ^1H para avaliação da pureza e conteúdo de OAc do PSC e PSW135. A terceira etapa consistiu na adaptação do método de EC para determinação da pureza do PSW135. Na quarta realizou-se um estudo dos parâmetros de pré-validação do método de RMN de ^1H para quantificação dos polissacarídeos. E na última etapa foi realizada a comparação e avaliação estatística dos resultados obtidos nos diferentes métodos (RMN, EC e UV-Vis).

4.1- Identidade dos polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135 por RMN de ^1H

A identidade dos polissacarídeos PSC e PSW135 foi realizada, através de experimentos de RMN de ^1H unidimensionais (1D), com o objetivo de confirmar a identidade das amostras utilizadas por Bio-Manguinhos. Os espectros obtidos foram comparados com os dados descritos na literatura e com os espectros de RMN obtidos com os padrões de NANA e galactose. Esses padrões foram utilizados para auxiliar os assinalamentos dos polissacarídeos e selecionar o melhor sinal para quantificação dos mesmos (Lemercinier & Jones, 1996; Jones & Lemercinier, 2002; Bardotti et al., 2005; Jones, 2005; Cuello et al., 2007; Gudlavalleti et al., 2007; Silveira et al., 2007; Bardotti et al., 2008; Vipond et al., 2012).

4.1.1- PSC

Para obter o perfil espectroscópico do PSC foram adquiridos espectros do padrão de NANA (Figura 4.1 e Figura 4.2) e de dois lotes utilizados por Bio-Manguinhos na produção da vacina meningocócica polissacarídica (Figura 4.3 e Figura 4.4).

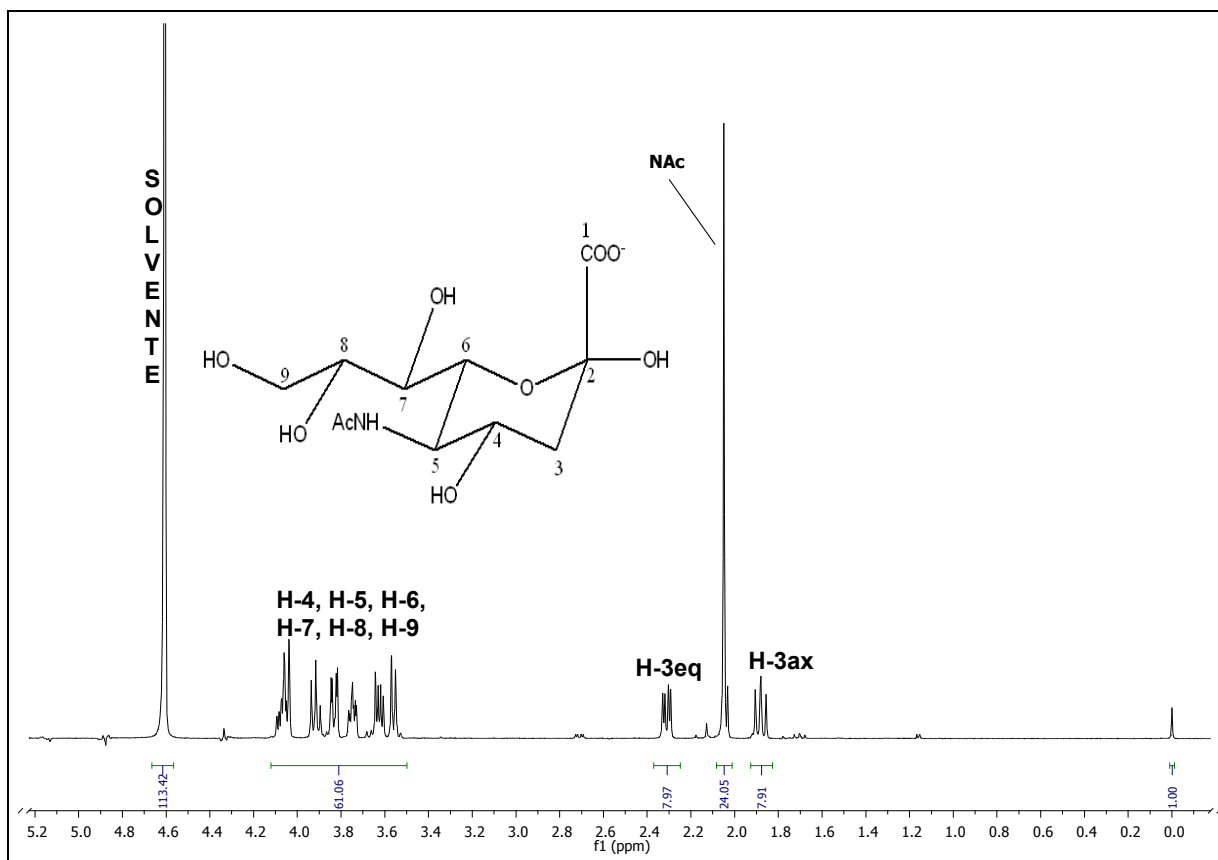


Figura 4.1 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de NANA em D_2O , com DSS (0,0ppm).

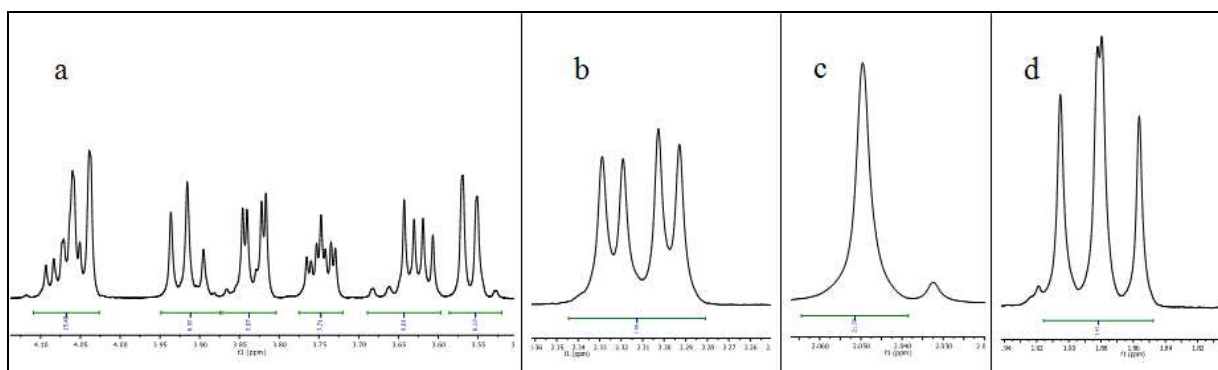


Figura 4.2 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de NANA com ampliação dos seus sinais. (a) sinais referentes aos H-4, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9; (b) duplo-duplete H-3_{eq}; (c) simpleto CH_3 do NAC; (d) triplete H-3_{ax}.

No espectro de RMN de ^1H do padrão de NANA, apresentado na Figura 4.1 e na Figura 4.2, os sinais são bem característicos e dispersos na janela espectral. Os hidrogênios H-3_{ax} e H-3_{eq} encontram-se a 1,88ppm e 2,30ppm, respectivamente; e os sinais observados na região entre 3,50 a 4,12ppm foram atribuídos aos hidrogênios do anel piranosídico e da cadeia alifática (H-4, H-5,

H-6, H-7, H-8 e H-9). Além disso, o sinal referente aos hidrogênios da metila do grupo NAc (NCOCH_3), foram facilmente assinalados e encontram-se em 2,10ppm (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Deslocamento químico dos hidrogênios do padrão de NANA em D_2O .

Hidrogênio	δ ^1H (ppm)	Posição	δ ^1H (ppm)
3_{ax}	1,88 (t, 1H) (Figura 4.2 d)	4, 5, 6, 7, 8, 9	3,50 a 4,12 (---, 6H) (Figura 4.2 a)
3_{eq}	2,30 (dd, 1H) (Figura 4.2 b)	CH_3 do NAc	2,10 (s, 3H) (Figura 4.2 c)

Por se tratar de polímero, os sinais no espectro de RMN de ^1H do PSC encontram-se sobrepostos. Entretanto, os sinais característicos dos hidrogênios H-7 e H-8 a 5,10 ppm foram facilmente identificados. Os sinais na região de 3,30 a 4,20 ppm foram atribuídos aos hidrogênios do anel piranosídico e da cadeia alifática (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9). Entretanto no PSC os hidrogênios H- 3_{ax} e H- 3_{eq} , ora possuem grupos vizinhos O-acetilados ou não. Assim os hidrogênios H-3 possuem diferentes deslocamentos químicos (1,50 e 1,75ppm para o H- 3_{ax} ; e 2,50 e 2,80ppm para o H- 3_{eq}). Também foram observados sinais característicos, dos hidrogênios da metila do grupo NAc (NCOCH_3), em aproximadamente 2,00ppm; e dos hidrogênios da metila do grupo OAc (OCOCH_3), em aproximadamente 2,20ppm (Figura 4.3, Figura 4.4 e Tabela 4.2).

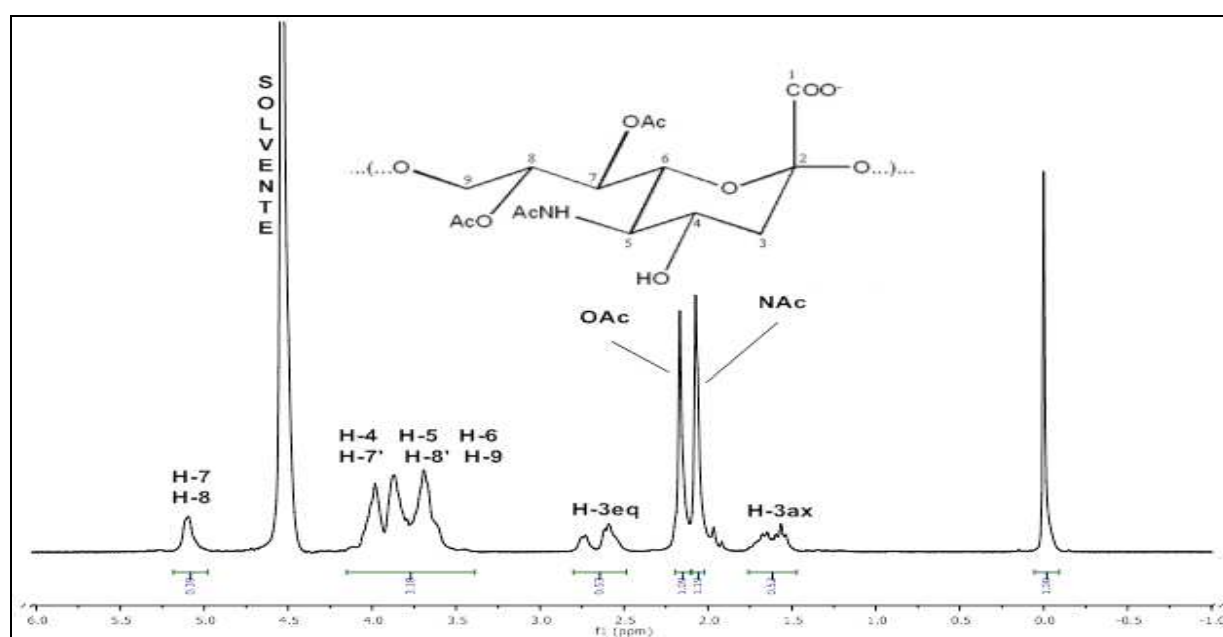


Figura 4.3 – Espectro de RMN de ^1H 400MHz, representativo para ambos os lotes analisados de PSC em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm). Lote: IMC0011.

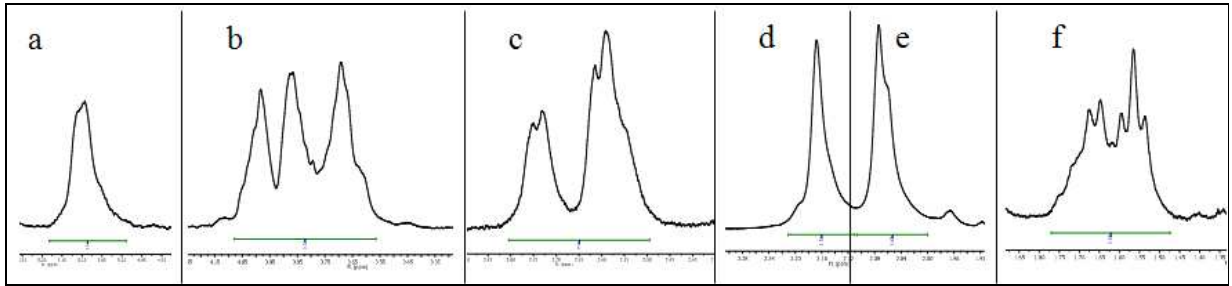


Figura 4.4 – Espectro de RMN de ^1H 400MHz, do PSC em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) sinal referente aos H-7e H-8; (b) multiplete H-4, H-5, H-6, H-7, H-8 e H-9; (c) duplete H-3_{eq}; (d) simpleto CH_3 do OAc; (e) simpleto CH_3 do NAc; (f) tripleto H-3_{ax}. Lote: IMC0011.

A análise dos espectros de RMN de ^1H de ambos os lotes de PSC permitiu identificar deslocamentos químicos característicos da molécula, condizentes com os dados descritos na literatura (Lemercinier & Jones, 1996). Os sinais observados nesses espectros também são similares aos observados no espectro de RMN de ^1H do padrão NANA.

Tabela 4.2- Deslocamento químico dos hidrogênios do PSC em D_2O .

Hidrogênio	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm) descrito na literatura*
3 _{ax}	1,50 e 1,75 (t, 1H) (Figura 4.4 f)	1,60 a 1,90
3 _{eq}	2,50 e 2,80 (d, 1H) (Figura 4.4 c)	2,50 a 2,90
4, 5, 6, 7, 8 e 9	3,30 a 4,20 (m, 6H) (Figura 4.4 b)	3,40 a 4,30
7 e 8	5,10 (---, 2H) (Figura 4.4 a)	4,90 a 5,20
CH_3 do NAc	2,00 (s, 3H) (Figura 4.4 e)	
CH_3 do OAc	2,20 (s, 3H) (Figura 4.4 d)	1,90 a 2,30

*deslocamentos químicos publicados por Lemercinier e Jones, 1996.

4.1.2- PSW135

O mesmo procedimento foi realizado para o PSW135. Foram adquiridos espectros de RMN de ^1H do padrão de galactose (Figura 4.5 e Figura 4.6) e de dois lotes de PSW 153 produzidos por Bio-Manguinhos (Figura 4.7 e Figura 4.8).

A análise do espectro de galactose (Figura 4.5 e Figura 4.6) mostrou que o sinal característico do hidrogênio anomérico (H-1') encontra-se a 5,25ppm; e os sinais na região de

3,40 a 4,50ppm atribuídos aos hidrogênios do anel da galactose e do metileno da cadeia alifática (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3- Deslocamento químico dos hidrogênios do padrão de galactose em D₂O.

Hidrogênio	δ ¹ H (ppm)
1	5,25 (d, 1H) (Figura 4.6 a)
2, 3, 4, 5, 6	3,40 a 4,50 (m, 5H) (Figura 4.6 b)

Na análise do espectro de RMN de ¹H do PSW135 foi possível verificar a presença do sinal característico do hidrogênio anomérico (H-1') a 5,10 ppm, e dos sinais dos hidrogênios do anel piranosídico e da cadeia alifática dos monossacarídeos NANA e galactose (H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-2', H-3', H-4', H-5'e H-6') na região de 3,60 a 4,10 ppm. Além disso, foram observados os sinais referentes aos hidrogênios H-3_{ax} e H-3_{eq} do monômero NANA a 1,67ppm e 2,88ppm, respectivamente e o sinal referente ao deslocamento químico dos hidrogênios da metila do grupo NAc (NCOCH₃) a 2,10ppm (Tabela 4.4). Como o PSW135 é um polímero constituído por dois monômeros (NANA e galactose), foi necessário diferenciar a numeração das cadeias principais destes monômeros. Então para diferenciar as cadeias, para o monômero galactose utilizou-se a numeração acrescida de uma marcação, como por exemplo, H-1'.

Dados da literatura mostram que quando o PSW135 encontra-se *O*-acetilado os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-9 e H-9'e H-7 são diferentes (Tabela 4.4; Lemercinier & Jones, 1996; Jones & Lemercinier, 2002). Além da presença dos sinais encontrados em 2,10 a 2,30ppm atribuídos aos hidrogênios da metila do grupo OAc. Como os dois lotes analisados por RMN de ¹H não apresentaram sinais característicos do grupamento OAc, podemos confirmar que a cepa utilizada para a produção do PSW135, em Bio-Manguinhos, geram polissacarídeos desacetilados. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pela técnica de espectrofotometria UV-Vis e RMN de ¹H, realizados anteriormente por Bio-Manguinhos, onde também não foi detectada a presença de grupamentos OAc no PSW135.

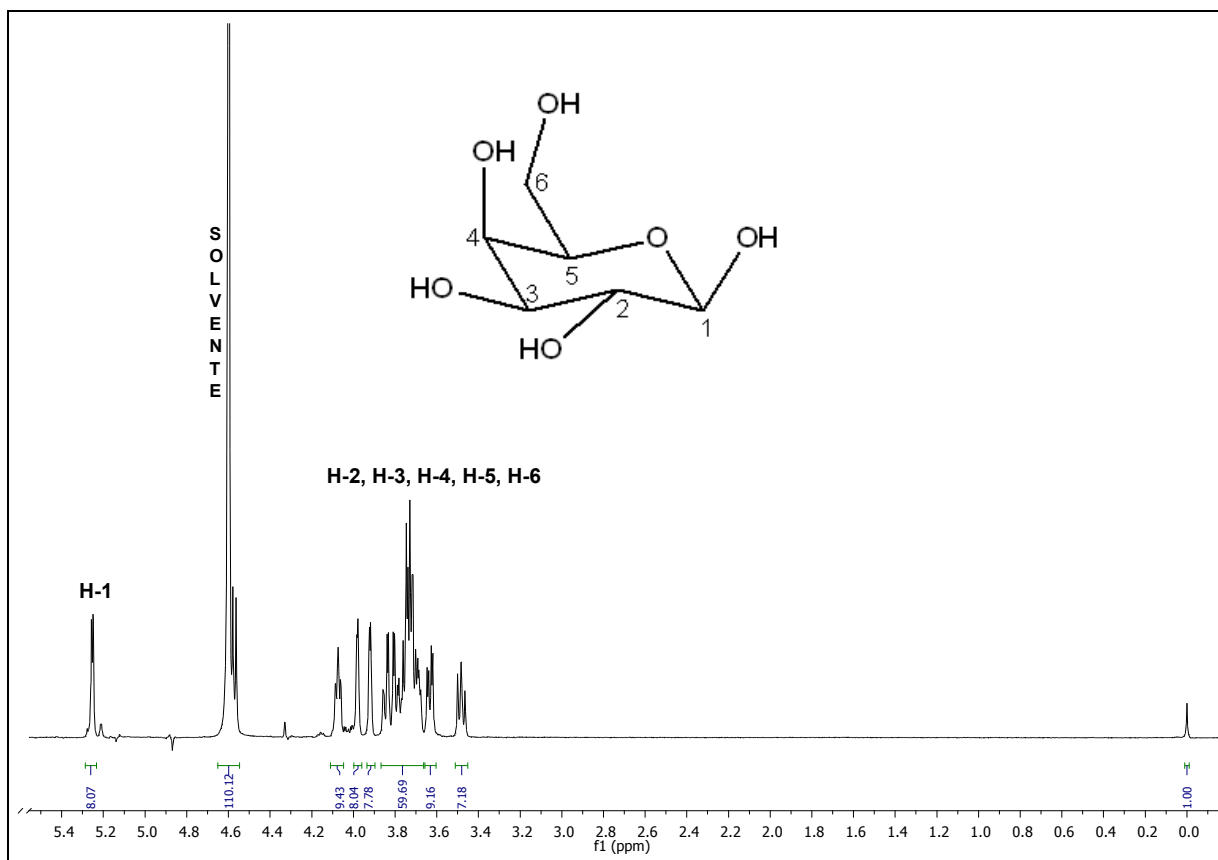


Figura 4.5 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de galactose em D_2O , com DSS (0,0ppm).

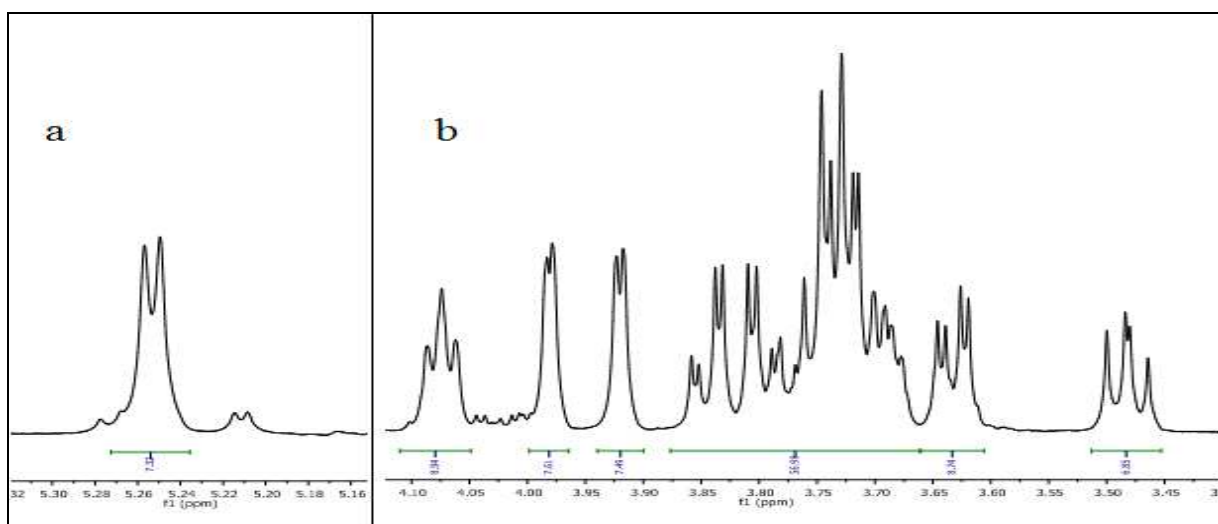


Figura 4.6 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão de galactose em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) dupletto H-1; (b) sinais referentes aos H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6.

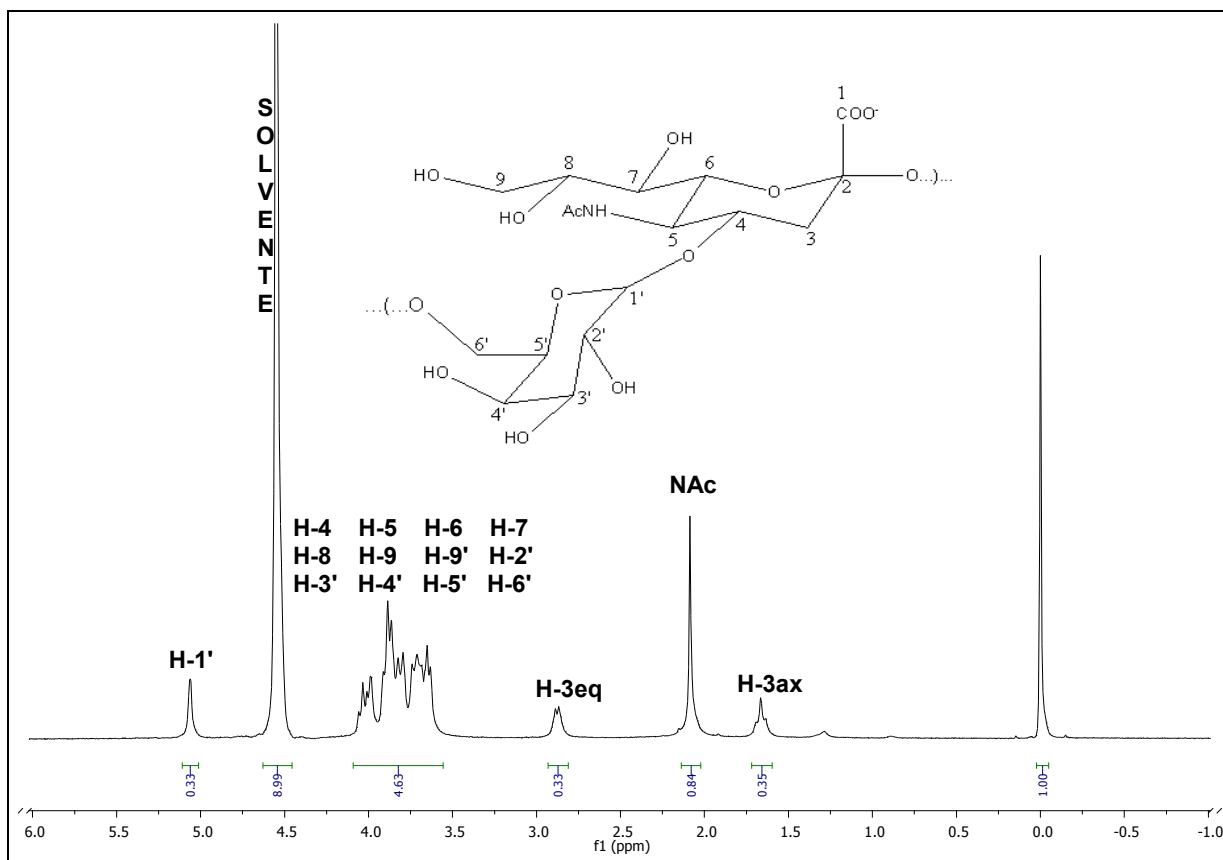


Figura 4.7 - Espectro de RMN de ^1H 400MHz, representativo para ambos os lotes de PSW135 em D_2O , com TSP- d_4 (0,0ppm). Lote: IMW0003.

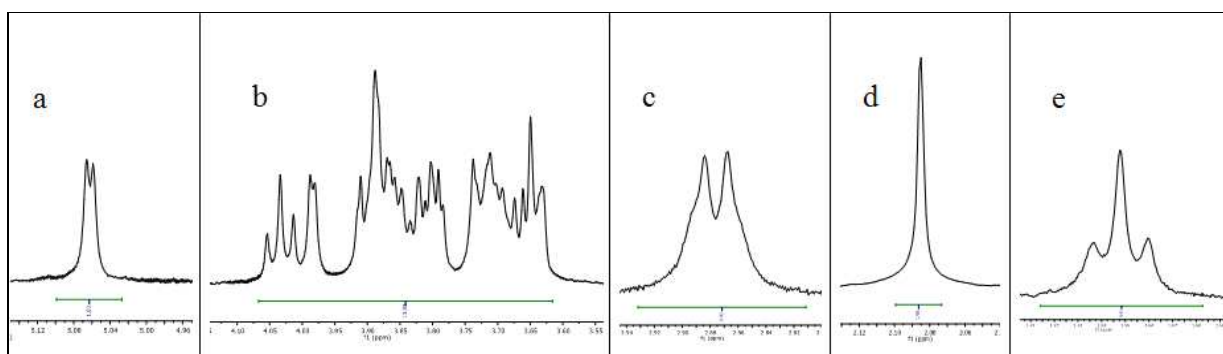


Figura 4.8 - Espectro de RMN de ^1H 400MHz, do PSW135 em D_2O , com ampliação dos seus sinais. (a) duplete H-1'; (b) sinais referentes aos H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6; (c) duplete H-3eq; (d) simpleto CH_3 do NAC; (e) triplete H-3ax. Lote: IMW0003.

Cabe ressaltar que não existem muitos estudos na literatura a respeito da importância da presença do grupo OAc no PSW135 para a imunogenicidade e atividade funcional da vacina. A OMS (WHO, 1976), requer um conteúdo mínimo de 0,3mmol/g de conteúdo de *O*-acetil no PSW135. Estudo realizado por Longworth et al. (2002) com diferentes cepas de polissacarídeos

meningocócicos, mostrou que na Europa a maioria das cepas de PSW135 (complexo ET 37) analisadas era desacetilada (92%). Outro estudo, realizado por Gudlavalleti et al. (2007), demonstrou que *O*-acetilação do PSW135 não possui importância significativa para produção de anticorpos contra o agente, concluindo que a presença do grupo OAc, no PSW135, não é crítico, do ponto de vista imunológico.

Assim como no PSC, a análise dos espectros de RMN de ^1H do PSW135 permitiu identificar deslocamentos químicos característicos da molécula, condizentes àqueles descritos na literatura (Lemercinier & Jones, 1996) e observados no espectro do padrão de NANA e galactose.

Tabela 4.4- Deslocamento químico dos hidrogênios do PSW135 em D_2O .

Hidrogênio	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm) descrito na literatura*
3_{ax}	1,67 (t, 1H) (figura 4.8 e)	1,50 a 1,80
3_{eq}	2,88 (d, 1H) (figura 4.8 c)	2,80 a 3,00
4, 5, 6, 7, 8, 9, 2', 3', 4', 5' e 6'	3,60 a 4,10 (m, 11H) (Figura 4.8 b)	3,60 a 4,10
1'	5,10 (d, 1H) (Figura 4.8 a)	4,90 a 5,10
CH_3 do NAc	2,10 (s, 3H) (Figura 4.8 d)	2,00 a 2,20
CH_3 do OAc	Não observado	2,10 a 2,30
H-9 e H-9'	Não observado	4,10 a 4,50
H-7	Não observado	5,10 a 5,20
H-9'	Não observado	3,40 a 3,60

*deslocamentos químicos publicados por Lemercinier e Jones, 1996.

A aplicação da técnica de RMN na avaliação da identidade e integridade de polissacarídeos com potencial vacinal tem sido proposta por vários autores (Lemercinier e Jones, 1996; Jones & Lemercinier, 2002; Bardotti et al., 2005; Jones, 2005; Cuello et al., 2007; Gudlavalleti et al., 2007; Silveira et al., 2007; Bardotti et al., 2008; Vipond et al., 2012). A Farmacopéia Européia (2005) sugere que o atual teste de identidade que utiliza provas sorológicas, seja substituído pela RMN. Esta técnica tem sido descrita como altamente sensível e reprodutível para o controle de qualidade de polissacarídeos bacterianos utilizados na produção de vacinas (Jones & Lemercinier, 2002).

4.2- Otimização dos parâmetros de aquisição para os espectros quantitativos de RMN de ^1H

Os lotes IMC0011 e IMW0003 de PSC e PSW135, respectivamente, foram utilizados na etapa de otimização dos parâmetros de aquisição. Para este estudo as amostra foram pesadas e diluídas em D_2O , acrescidas de 1% de TSP- d_4 . A escolha deste padrão interno é devido a sua não interação com os polissacarídeos analisados, a não sobreposição de seu sinal com os sinais da amostra e a sua utilização descrita na literatura para a quantificação de polissacarídeos meningocócicos (Garrido et al., 2012; Vipond et al., 20012) . Os parâmetros de aquisição (número de varreduras e temperatura) foram selecionados em função da razão sinal/ruído ($S/R > 250$) e o tempo de espera através da sequencia I.R., onde $d_1 = 5 \times T_1$.

4.2.1- Tempo de espera – Delay (d_1)

O d_1 utilizado na aquisição dos espectros quantitativos foi determinado, através da sequência de pulso de I.R., em função do valor do tempo de relaxação longitudinal (T_1) do hidrogênio mais longo dos sinais presentes nas amostras de PSC e PSW135.

Os valores de T_1 , obtidos para os hidrogênios presentes na amostra de PSC, são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5- Valores de T_1 dos hidrogênios presentes na amostra de PSC.

Hidrogênios	T_1	Hidrogênios	T_1
3_{ax}	820,879ms	7 e 8	943,459ms
	805,291ms	CH_3 do NAc	1,635seg
3_{eq}	664,961ms	CH_3 do OAc	1,373seg
	623,079ms	TSP- d_4	4,853seg
4, 5, 6, 7, 8 e 9	1,360seg	---	---

ms = milissegundos; seg = segundos

Nesta tabela, são observados que os hidrogênios da molécula de PSC apresentaram valores de T_1 na faixa de 623,079ms a 1,635seg, enquanto os hidrogênios do padrão de referência TSP- d_4 apresentaram valor de T_1 de 4,853seg.

A Tabela 4.6 apresenta os valores de T_1 para os hidrogênios da molécula de PSW135. Os resultados mostram que os hidrogênios apresentaram valores de T_1 na faixa de 524,200ms a

1,359seg, enquanto os hidrogênios do padrão de referência TSP- d_4 apresentaram valor de T_1 de 4,732seg.

Tabela 4.6- Valores de T_1 dos hidrogênios presentes na amostra de PSW135.

Hidrogênios	T_1	Hidrogênios	T_1
3_{ax}	1,000seg	1'	524,200ms
3_{eq}	1,160seg	CH ₃ do NAc	1,359seg
4, 5, 6, 7, 8, 9, 2', 3', 4', 5' e 6'	727,81ms	TSP- d_4	4,732seg

ms = microssegundos; seg = segundos

Para ambas as moléculas, o valor de T_1 , referente aos hidrogênios do TSP- d_4 foi utilizado para determinar o d_1 na aquisição dos espectros quantitativos, pois correspondem aos hidrogênios mais lentos.

Segundo a literatura o valor de d_1 deve ser no mínimo cinco vezes o valor de T_1 , referente ao hidrogênio mais lento encontrado (Holzgrabe, 2010). Em função do valor de T_1 do TSP- d_4 , encontrado nas amostras de PSC (24,26seg) e PSW135 (23,66seg), foi padronizado um d_1 de 25seg.

Recentemente, Vipond et al. (2012) utilizaram a RMNq para determinar a pureza de uma amostra de PSC candidata a padrão certificado internacional. Neste estudo os autores também utilizaram o TSP- d_4 como padrão interno e um d_1 igual a 26seg, obtido através da sequência de pulso de I.R. compatível com o valor de d_1 encontrado neste estudo.

4.2.2- Número de Varreduras – número de *scans* (ns)

Para determinar o número de varreduras a ser utilizado para a aquisição dos espectros quantitativos foi empregado o valor de d_1 determinado anteriormente (25seg). Foram adquiridos espectros de RMN de 1H variando apenas o ns (32 a 128), e em seguida calculado o valor da razão S/R. Os valores obtidos nos espectros de PSC são apresentados na Tabela 4.7. Para o cálculo da razão S/R, foi utilizado o hidrogênio H- 3_{eq} a 2,50 ppm do PSC (Tabela 4.7) e o programa Topspin 2.1.

Os valores da razão S/R variam de 340,15 a 453,75. Os resultados confirmam a influência do ns sobre a razão S/R. Foi observada uma grande variação nos valores da razão S/R entre os espectros obtidos com ns igual a 32 e 64, o que não é observado entre os espectros obtidos com

ns 64 e 128. Apesar da literatura indicar que uma razão S/R > 250 é suficiente para os experimentos de RMNq, optou-se pela utilização de um ns igual a 64 para a obtenção de espectros com maior resolução (Holzgrabe, 2010).

Tabela 4.7- Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ^1H do PSC, calculada em função da variação do número de *scans*

	32 scans	64 scans	128 scans
δ (ppm)	2,50	2,50	2,50
Relação*	26,20	26,20	26,20
Razão S/R	340,15	451,21	453,75

*janela espectral, em Hertz, obtida através da integração do sinal estudado, que deve ser utilizada para o cálculo do ruído.

O mesmo procedimento foi realizado para o PSW135, e o cálculo realizado com o hidrogênio anomérico (H-1') a 5,10ppm. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.8, os valores obtidos no cálculo da razão S/R para aquisição de espectros quantitativos do PSW135, são necessários 64 varreduras para se obter razão S/R > 250. Este resultado foi inesperado, desde que com o aumento do número de *scans* espera-se um aumento do valor da razão S/R.

De forma a padronizar os experimentos, o número de varreduras selecionado foi ns 64, condizente com a literatura, onde a razão S/R para um espectro de RMN de ^1H deve ser maior que 250 (Holzgrabe, 2010).

Tabela 4.8- Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ^1H do PSW135, calculada em função da variação do número de *scans*.

	32 scans	64 scans	128 scans
δ (ppm)	5,10	5,10	5,10
Relação*	15,26	15,26	15,26
S/R	214,04	302,60	241,29

*janela espectral, em Hertz, obtida através da integração do sinal estudado, que deve ser utilizada para o cálculo do ruído.

4.2.3- Temperatura (T)

Outro parâmetro estudado foi o efeito da temperatura. Estudos preliminares realizados mostraram que a temperatura tem uma forte influência na resolução dos sinais de RMN ^1H dos polissacarídeos. Os valores de d_1 e ns padronizados foram usados no estudo do efeito da

temperatura ($d_1 = 25\text{seg}$ e $ns = 64$). Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos variando a temperatura (303 a 323K) e em seguida a razão S/R calculada. Os resultados referentes ao hidrogênio H-3_{eq} a 2,50 ppm do PSC estão descritos na Tabela 4.9, enquanto os resultados referentes ao hidrogênio anomérico (H-1') do PSW135 estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.9- Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ^1H do PSC, calculada em função da variação da temperatura.

	303K	313K	323K
δ (ppm)	2,50	2,50	2,50
Relação*	25,73	25,73	25,73
S/R	417,54	443,76	438,97

*janela espectral, em Hertz, obtida através da integração do sinal estudado, que deve ser utilizada para o cálculo do ruído.

Tabela 4.10- Valores da razão S/R, para os espectros de RMN de ^1H do PSW135, calculada em função da variação da temperatura.

	303K	313K	323K
δ (ppm)	5,10	5,10	5,10
Relação*	14,87	14,87	14,87
S/R	379,56	403,34	397,65

* janela espectral, em Hertz, obtida através da integração do sinal estudado, que deve ser utilizada para o cálculo do ruído.

Para ambos os polissacarídeos, é possível observar que a razão S/R sofre influência com a variação da temperatura. Resultados inesperados foram encontrados, já que os espectros obtidos com a temperatura de 313K apresentaram o maior valor de razão S/R e a melhor resolução nos sinais, o que seria esperado para a temperatura de 323K. Sugere-se que esse resultado possa ser devido à possibilidade de formação de agregados no polissacarídeo ou ainda que a diferença encontrada entre as duas temperaturas não apresente diferença significativa. De acordo com os resultados encontrados, a temperatura de 313K é a mais indicada para a utilização na aquisição dos espectros quantitativos de ambos os sorogrupos. Os valores de S/R encontrados para essa temperatura, também, são compatíveis com aqueles indicados na literatura (Holzgrave, 2010).

4.2.4- Janela espectral (SW)

A SW foi determinada utilizando-se uma região adicional de 3ppm nas extremidades do espectro (Holzgrave, 2010). Ambos os polissacarídeos apresentam sinais característicos dentro do

mesmo intervalo de deslocamento químico (0,0 a 5,2ppm) e como consequência utilizaram o mesmo tamanho de SW para a aquisição dos espectros quantitativos. Ao adicionarmos 3ppm às extremidades dos espectros do PSC e PSW135 foi obtida uma SW de tamanho igual a 12ppm (4810Hz). O pulso de excitação não foi dado no meio da janela espectral (O1P-3,0ppm) como recomendado (Holzgrabe, 2010), pois os sinais dos hidrogênios H-3 do anel piranosídeo de ambos os sorogrupos estão situados nesta região. Optou-se então, em utilizar um O1P igual a 3,22ppm para que não ocorresse distorção dos sinais.

4.3- Avaliação dos resultados obtidos por RMNq

Em função dos resultados obtidos, os valores selecionados para os parâmetros de aquisição dos espectros quantitativos de RMN de ^1H para os polissacarídeos PSC e PSW135 são descritos na Tabela 4.11. Com estes parâmetros o tempo de aquisição dos espectros de RMNq é de aproximadamente 35 minutos.

Tabela 4.11- Parâmetros de RMN utilizados na obtenção de espectros quantitativos de PSC e PSW135

Parâmetros de aquisição para PSC e PSW135			
Campo magnético (MHz)	500	d_1 (seg)	25
número de varreduras	64	janela spectral (ppm)	12
temperatura (K)	313	padrão interno	TSP- d_4
Sem rotação da amostra			

Para os experimentos quantitativos foram utilizados as sequências de RMN ^1H tradicionais (zg) e GARP (zgif).

De acordo com os espectros obtidos inicialmente para o cálculo de percentual da pureza e teor de OAc do PSC foram selecionados os hidrogênios H-7 e H-8 ($\approx 5,10$ ppm) e o multipletto referente aos hidrogênios do anel piranosídico e cadeia alifática ($\approx 3,30$ a $4,20$ ppm). É importante ressaltar que o PSC é formado por unidades repetidas de NANA, que apresentam grupos OAc às vezes no carbono 7 ou no carbono 8. A escolha desses sinais deve-se ao fato do espectro de PSC não apresentar outros sinais adequadamente separados para garantir uma integração confiável e serem utilizados para o cálculo de pureza e teor de grupos OAc. Os resultados obtidos nos experimentos zg estão apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12- Percentual de pureza e conteúdo de grupos OAc presentes nos lotes de PSC, determinados por RMNq utilizando uma sequência padrão de hidrogênio.

Lotes	RMNq utilizando sequência padrão de hidrogênio			
	Pureza (%)*		OAc ($\mu\text{mol/mg}$)*	
IMC0011	89,13		2,53	
	88,17	$\bar{X} = 88,92 \pm 0,67$	2,55	$\bar{X} = 2,55 \pm 0,02$
	89,47		2,57	
IMC0013	86,67		2,50	
	87,15	$\bar{X} = 86,77 \pm 0,34$	2,50	$\bar{X} = 2,50 \pm 0,00$
	86,50		2,50	
IMC0018	92,21		2,45	
	91,91	$\bar{X} = 92,17 \pm 0,25$	2,48	$\bar{X} = 2,46 \pm 0,02$
	92,40		2,45	
IMC1001	82,55		2,49	
	82,89	$\bar{X} = 82,74 \pm 0,17$	2,51	$\bar{X} = 2,50 \pm 0,17$
	82,79		2,51	

*resultados obtidos através de três diferentes integrações de um único espectro. Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

Os resultados de percentual pureza variam entre 82,55% a 92,40% e encontram-se acima da especificação de aprovação desta molécula ($\geq 80\%$). O mesmo é observado nos resultados obtidos para a teor de grupos OAc que variam de 2,45 a 2,57 $\mu\text{mol/mg}$, encontrando-se acima da especificação de aprovação ($\geq 1,5 \mu\text{mol/mg}$).

Em seguida, espectros de RMNq de ^1H dos lotes de PSC foram obtidos utilizando a sequência GARP (com remoção dos sinais satélites de ^{13}C), para avaliação da interferência dos sinais satélites na quantificação da pureza da molécula. Como esperado, os resultados de percentual pureza foram menores (79,56 a 88,89%), pois a remoção dos satélites acarreta a diminuição da área de integração dos sinais. O uso da sequência GARP induziu em média, uma diminuição de 3,3% no percentual de pureza. Entretanto, com exceção de um valor encontrado para o lote IMC1001, todos os outros percentuais de pureza encontram-se acima da especificação de aprovação desta molécula ($\geq 80\%$), entretanto, quando os valores de média são considerados, todos os lotes utilizados encontram-se aprovados. Por outro lado, todos os resultados obtidos para a concentração de grupos OAc encontram-se acima da especificação de aprovação ($\geq 1,5\mu\text{mol/mg}$), com uma variação de 2,07 a 2,64 $\mu\text{mol/mg}$ (Tabela 4.13).

Tabela 4.13- Percentual de pureza e conteúdo de grupos OAc presentes nos lotes de PSC, determinados por RMNq utilizando uma sequência GARP

Lotes	RMNq utilizando sequência GARP			
	Pureza (%)*		OAc ($\mu\text{mol/mg}$)*	
IMC0011	82,40	$\bar{X} = 82,34 \pm 0,16$	2,23	$\bar{X} = 2,23 \pm 0,01$
	82,46		2,24	
	82,15		2,23	
IMC0013	84,90	$\bar{X} = 84,81 \pm 0,09$	2,63	$\bar{X} = 2,61 \pm 0,04$
	84,82		2,57	
	84,71		2,64	
IMC0018	88,89	$\bar{X} = 88,38 \pm 0,51$	2,28	$\bar{X} = 2,27 \pm 0,01$
	88,38		2,27	
	87,87		2,26	
IMC1001	80,26	$\bar{X} = 80,20 \pm 0,61$	2,07	$\bar{X} = 2,08 \pm 0,02$
	79,56		2,07	
	80,77		2,11	

* resultados obtidos em triplicata. Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

A análise estatística dos resultados foi realizada para avaliar a significância das diferenças obtidas. Para esta avaliação foram construídos dois gráficos de erro, utilizando-se a média global de todos os resultados obtidos e um nível de confiança de 95% (Figura 4.9 e Figura 4.10). A análise destes gráficos mostrou que ambas as sequências, tanto para pureza quanto para teor de OAc apresentam variações de resultados semelhantes. Os intervalos de confiança de cada método não se sobrepõem, apontando diferença significativa ($p < 0,001$), entre as duas sequências para os valores de pureza (3,72%) e teor de OAc (0,20 $\mu\text{mol/mg}$). Estes gráficos, também permitem a visualização da margem de erro, no qual é possível estimar o valor de pureza médio (85,79%) e do teor de O-acetilação médio (2,40 $\mu\text{mol/mg}$) das amostras.

Outros estudos, presentes na literatura, comprovam que a sequência GARP para a quantificação de diferentes moléculas, incluindo o polissacarídeo meningocócico sorogrupo X (PSX), é a mais indicada (Holzgrabe, 2010; Garrido et al., 2012; Santos e Colnago, 2013).

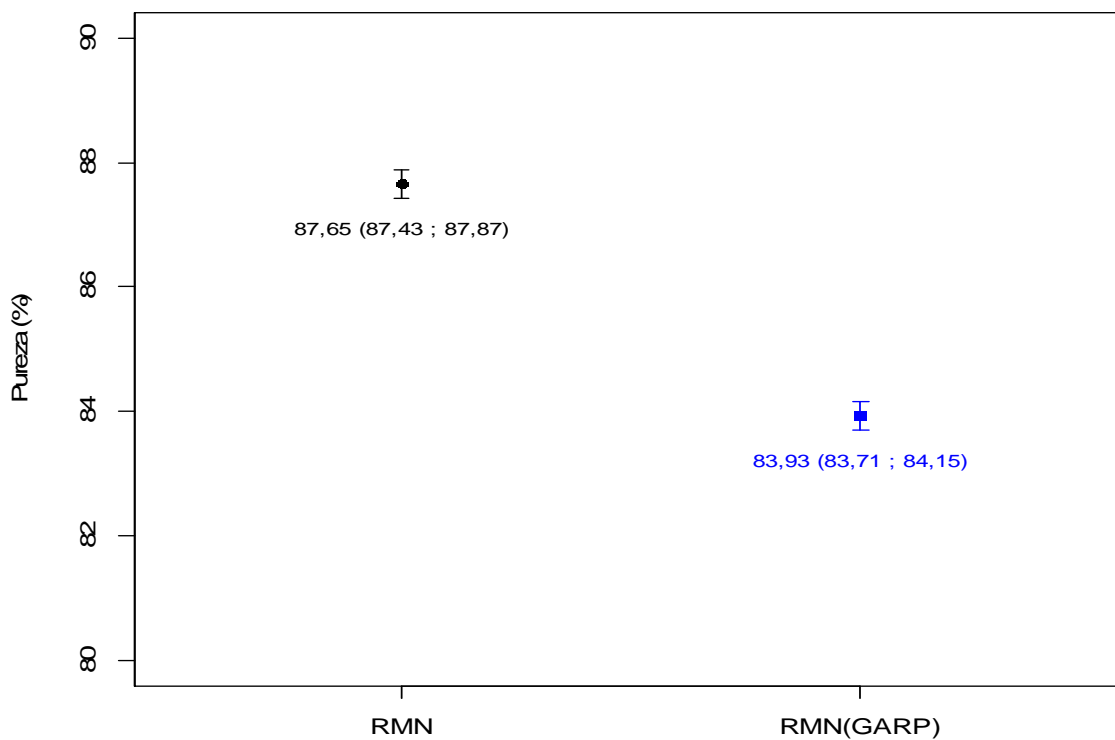


Figura 4.9- Gráfico de erro para avaliação dos resultados de pureza obtidos pela sequência padrão de hidrogênio X sequência GARP do PSC.

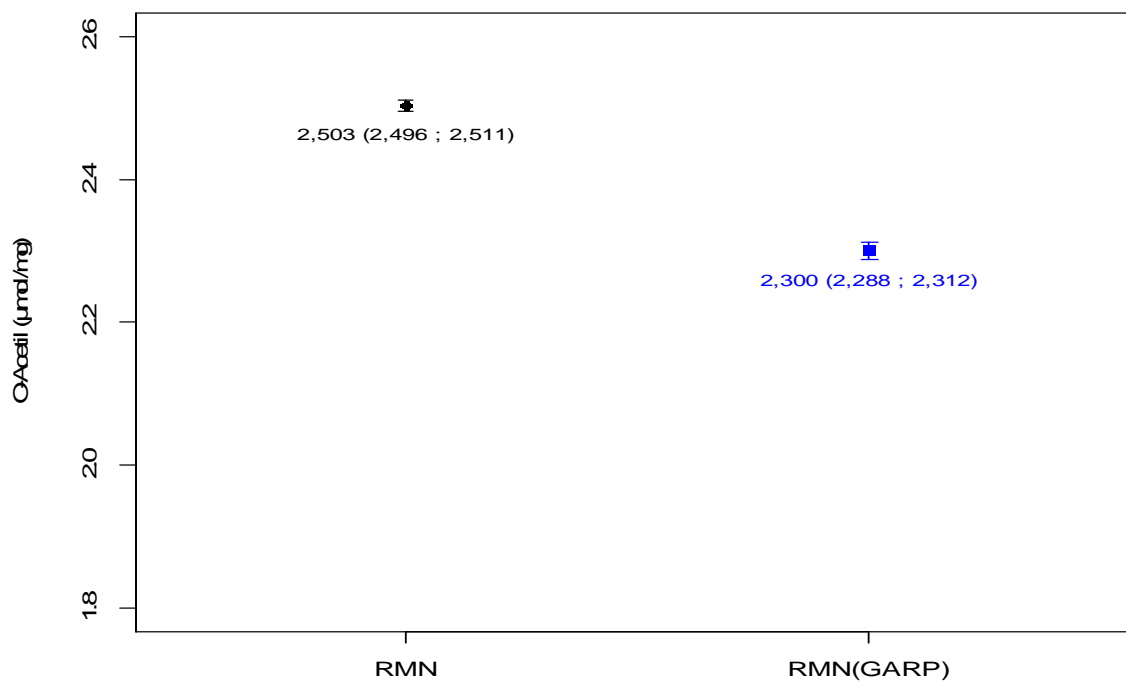


Figura 4.10- Gráfico de erro para avaliação dos resultados de concentração de OAc obtidos pela sequência padrão de hidrogênio X sequência GARP do PSC.

O mesmo procedimento foi utilizado para os estudos de RMNq de ^1H dos lotes de PSW135 (Tabela 4.14).

A escolha do sinal utilizado na quantificação foi realizada através da avaliação de espectros de amostras e padrões de NANA e galactose. Após a análise dos espectros dos padrões, foram selecionados os hidrogênios anoméricos H-1' (5,10ppm) da galactose, os hidrogênios H-3 (1,67ppm e 2,88ppm) e os hidrogênios do grupo metila do NAc (2,10ppm) do NANA para a avaliação preliminar dos hidrogênios a serem utilizados no cálculo de percentual de pureza.

Os resultados de pureza apresentaram valores que variam de 66,89% a 100,67%. A comparação dos resultados obtidos apresentaram diferenças na ordem de 33% entre o maior e menor resultado encontrado. Porém, até o presente momento não foi possível inferir os motivos da discrepância nos resultados, mas sugere-se a possibilidade de presenças de impurezas ou problemas no preparo da amostra. O lote IMW0006, apesar de estar aprovado pelo Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos e do Instituto Finlay (Cuba), apresenta os menores valores de pureza.

Tabela 4.14- Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por RMNq utilizando uma sequência padrão de hidrogênio

Lotes	RMNq utilizando sequência padrão de hidrogênio							
	Pureza (%)							
	utilizando H-1'		utilizando NAc		utilizando H-3 _{ax}		utilizando H-3 _{eq}	
IMW0003	93,82		85,80		96,28		94,45	
	93,00	$\bar{X} = 93,20 \pm$	85,58	$\bar{X} = 85,42 \pm$	96,85	$\bar{X} = 96,56 \pm$	95,39	$\bar{X} = 94,95$
	92,78	0,55	84,87	0,49	96,54	0,29	95,01	$\pm 0,47$
IMW0006	81,60		67,83		80,04		77,33	
	81,47	$\bar{X} = 81,46 \pm$	67,07	$\bar{X} = 67,26 \pm$	82,23	$\bar{X} = 81,51 \pm$	79,22	$\bar{X} = 78,78$
	81,30	0,15	66,89	0,50	82,27	1,28	79,80	$\pm 1,29$
DF-007W	87,44		82,41		88,50		86,88	
	85,89	$\bar{X} = 86,45 \pm$	81,81	$\bar{X} = 82,53 \pm$	89,01	$\bar{X} = 88,87 \pm$	87,07	$\bar{X} = 86,94$
	86,01	0,86	83,38	0,79	89,09	0,32	86,86	$\pm 0,12$
DF-008W	96,68		84,15		100,67		93,30	
	96,99	$\bar{X} = 96,87 \pm$	85,70	$\bar{X} = 85,34 \pm$	98,49	$\bar{X} = 99,40 \pm$	92,08	$\bar{X} = 92,84$
	96,94	0,17	86,17	1,06	99,03	1,14	93,14	$\pm 0,66$

Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

Com o intuito de avaliar estatisticamente as diferenças de resultados obtidos pelos quatro sinais e apontar o sinal mais adequado a ser utilizado na quantificação, construiu-se um gráfico de erro (Figura 4.11) utilizando-se a média global dos resultados obtidos com um intervalo de confiança de 95%. Os resultados de pureza, obtidos pelos quatro sinais apresentaram uma baixa dispersão de valores, em torno de suas médias globais, além de apresentarem diferença significativa entre si ($p < 0,001$).

Seguindo a teoria da RMN, que sugere a utilização do sinal mais simples para os experimentos de quantificação, o hidrogênio do H-1' do monômero galactose seria mais recomendado. Os resultados obtidos com a análise deste sinal permitiria que todos os lotes fossem aprovados, pois estariam dentro da especificação. Além disso, o sinal do NAc (2,10ppm) também poderia ser utilizado. Entretanto, os valores de pureza obtidos a partir da integração deste sinal foram mais baixos que os outros três sinais avaliados. Mesmo que os dados descritos na literatura mostrem que a molécula de PSW135 é *N*-acetilada, necessita-se de um estudo mais detalhado para comprovação de que ela é totalmente *N*-acetilada ou se os valores encontrados estão relacionados com uma dificuldade de análise deste polímero devido ao seu tamanho molecular. Entretanto, este sinal foi utilizado para quantificação da pureza do PSX, segundo Garrido et al. (2012), gerando resultados satisfatórios. Por outro lado os valores de pureza calculados a partir dos sinais H-1', H-3ax e H-3eq foram similares, sugerindo a possibilidade de utilização de um destes sinais para fins de quantificação. Como não existem artigos publicados descrevendo a utilização da RMN para quantificação da pureza do PSW135, foi utilizado o sinal H-3eq (duplete, 2,88 ppm) já que outros estudos sugerem sua utilização para estudos de quantificação do PSC (Vipond et al., 2012).

Em seguida, espectros de RMNq de ^1H foram obtidos utilizando a sequência GARP e os resultados encontram-se na Tabela 4.15. Somente os resultados da integração do sinal H-3eq foram utilizados na quantificação. As amostras apresentaram pureza em torno de 66,76% a 89,36%. Novamente os resultados para o lote IMW0006 estão abaixo da especificação e são divergentes daqueles encontrados no método UV-Vis.

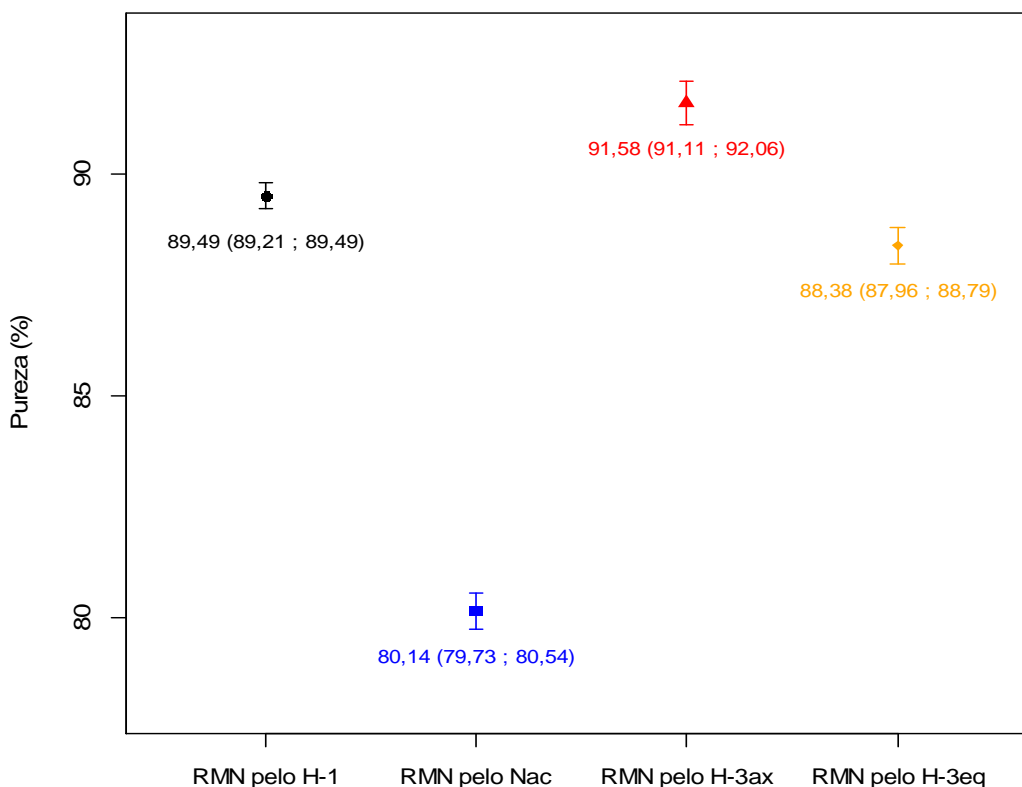


Figura 4.11- Gráfico de erro para avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes sinais do espectro de RMNq de ^1H do PSW135, utilizando a sequência padrão de hidrogênio.

Tabela 4.15- Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por RMNq através de uma sequência padrão de hidrogênio e de uma sequência GARP, utilizando o sinal do H-3_{eq} para os cálculos.

Lotes	RMNq utilizando sequência padrão de hidrogênio		RMNq utilizando sequência GARP	
	Pureza (%)		Pureza (%)	
IMW0003	94,45	$\bar{X} = 94,95 \pm 0,47$	89,36	$\bar{X} = 90,02 \pm 0,58$
	95,39		90,25	
	95,01		90,46	
IMW0006	77,33	$\bar{X} = 78,78 \pm 1,29$	67,63	$\bar{X} = 67,25 \pm 0,45$
	79,22		67,37	
	79,80		66,76	
DF-007W	86,88	$\bar{X} = 86,94 \pm 0,12$	83,53	$\bar{X} = 82,96 \pm 0,92$
	87,07		81,89	
	86,86		83,45	
DF-008W	93,30	$\bar{X} = 92,84 \pm 0,66$	88,98	$\bar{X} = 88,94 \pm 0,16$
	92,08		89,08	
	93,14		88,77	

Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

Com esses resultados foi construído um gráfico de erro (Figura 4.12), utilizando a média global dos resultados, para observar se há ou não diferença significativa entre as duas sequências. A análise do gráfico em questão mostrou que a sequência GARP apresentou uma variação maior dos resultados em relação à sequência padrão, o que é explicado pela presença dos baixos resultados do lote IMW0006. Os intervalos de confiança de cada sequência não se interceptam, apontando que as sequências apresentam uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre si.

Para ambas as moléculas, foram observadas diferenças significativas entre as sequências utilizadas, sugerindo que a presença dos satélites de ^{13}C possa estar superestimando os valores de pureza e teor de OAc. Mediante esta observação e conforme dados descritos na literatura, optou-se pela utilização da sequência GARP no método de RMNq desenvolvido.

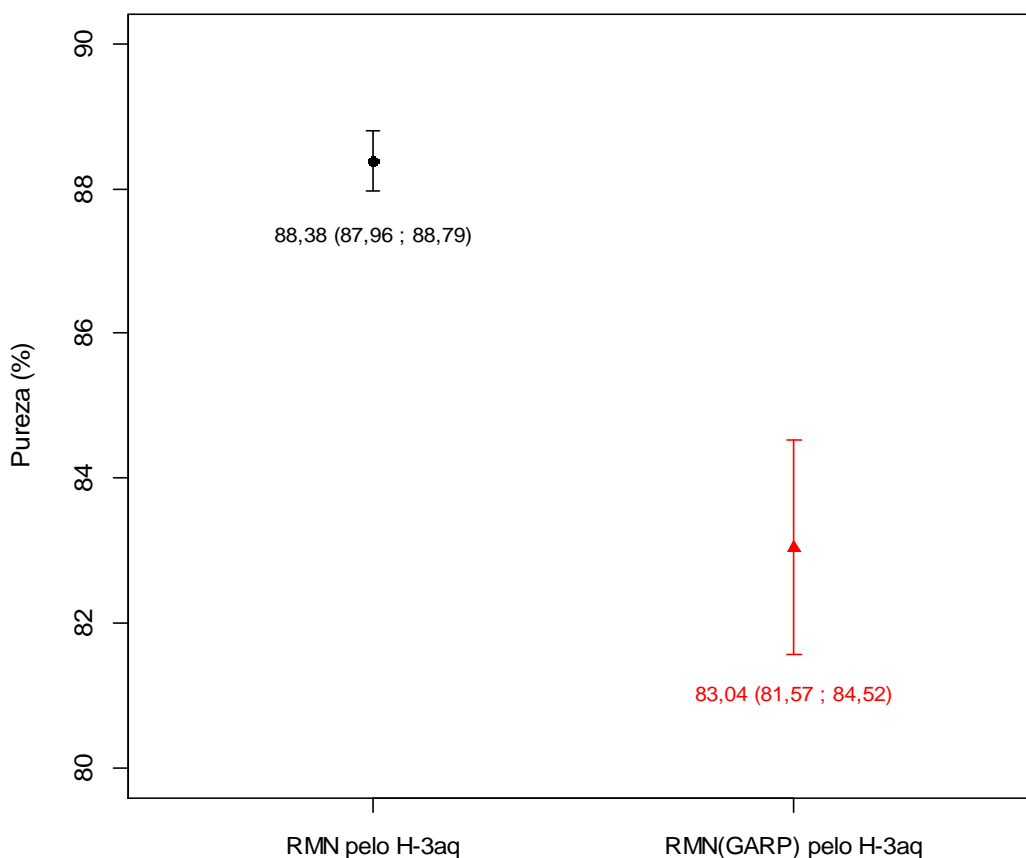


Figura 4.12- Gráfico de erro para avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes sinais do espectro de RMNq de ^1H do PSW135, utilizando a sequência padrão de hidrogênio.

4.4- Avaliação dos resultados obtidos por EC

As análises de EC foram realizadas utilizando quatro lotes de PSW135, padrão de NANA e galactose, com o objetivo de determinar a pureza do polissacarídeo em questão como um polímero (NANA e galactose), já que o método de espectrofotometria UV-Vis, atualmente utilizado no Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, somente determina o percentual de um monômero (NANA).

Foi obtido um eletroferograma dos padrões de NANA e galactose, em uma única amostra, com o objetivo de verificar o tempo de migração desses padrões. O eletroferograma é apresentado a seguir (Figura 4.13).

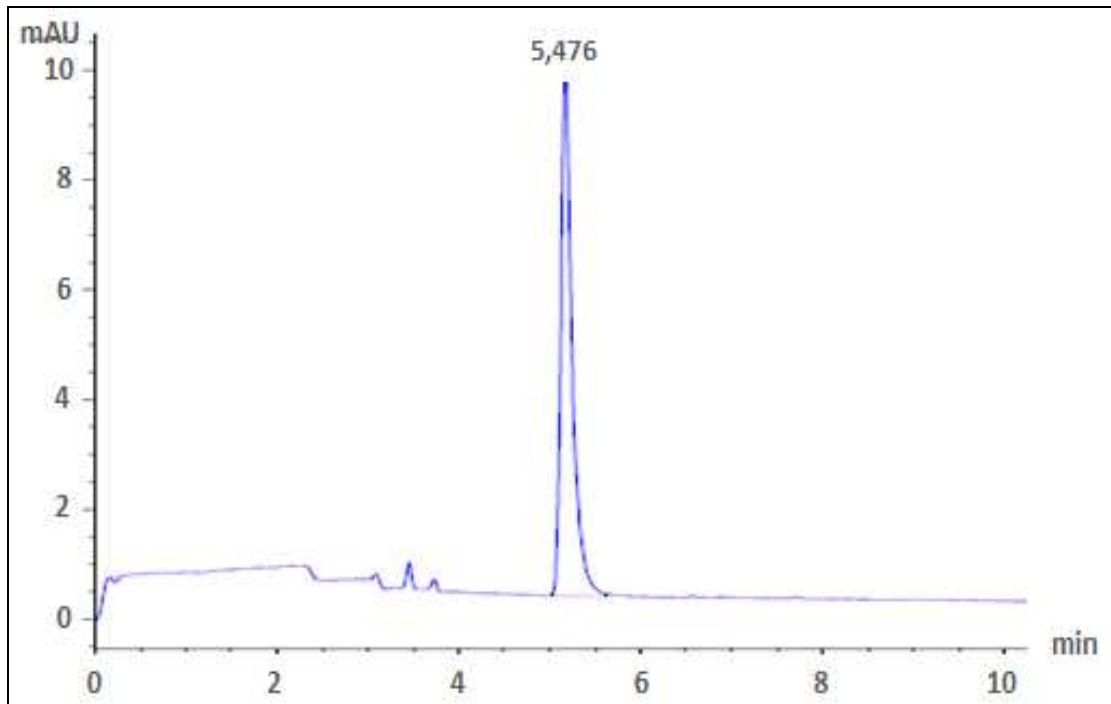


Figura 4.13- Eletroferograma referente à introdução da solução de NANA + galactose 500 μ g/mL. Condições de análise: Coluna de sílica fundida 40 cm x 50 μ m, tampão borato 20 mM, pH 9,3, 10 kV, injeção hidrodinâmica: 50 mbar por 5seg, temperatura de 25°C e tempo de corrida de 10 minutos.

Um único sinal de alta intensidade foi observado em torno de 5 minutos de análise, sugerindo que seja o sinal referente aos padrões NANA e galactose, que migraram em tempos similares. Também pode-se observar o aparecimento de pequenos sinais na região de 3 a 4

minutos, constantes em todos os eletroferogramas, inclusive no eletroferograma referente ao branco.

Com o intuito de verificar se ambos os padrões estão presentes no sinal encontrado, foram obtidos eletroferogramas de NANA e galactose, separadamente, e ambos são apresentados nas Figuras 4.14 e 4.15. Novamente, um único sinal de alta intensidade foi observado em um tempo de migração em torno de 5 minutos em ambos os eletroferogramas.

Em seguida foi obtido um eletroferograma de uma amostra de PSW135 utilizado na produção de vacinas meningocócicas polissacarídicas, em Bio-Manguinhos. O mesmo é apresentado na Figura 4.16, onde pode-se observar a presença de apenas um sinal com tempo de migração próximo a 5 minutos.

A avaliação dos quatro eletroferogramas demonstra que o sinal observado em torno de 5 minutos é referente ao PSW135, e que os parâmetros de análise utilizados, a partir daqueles descritos por Lamb et al. (2005), são adequados para determinar a identidade de tal polissacarídeo. Estes parâmetros, considerando uma alteração no tampão e no tempo de corrida, foram utilizados para a quantificação dos lotes de PSW135.

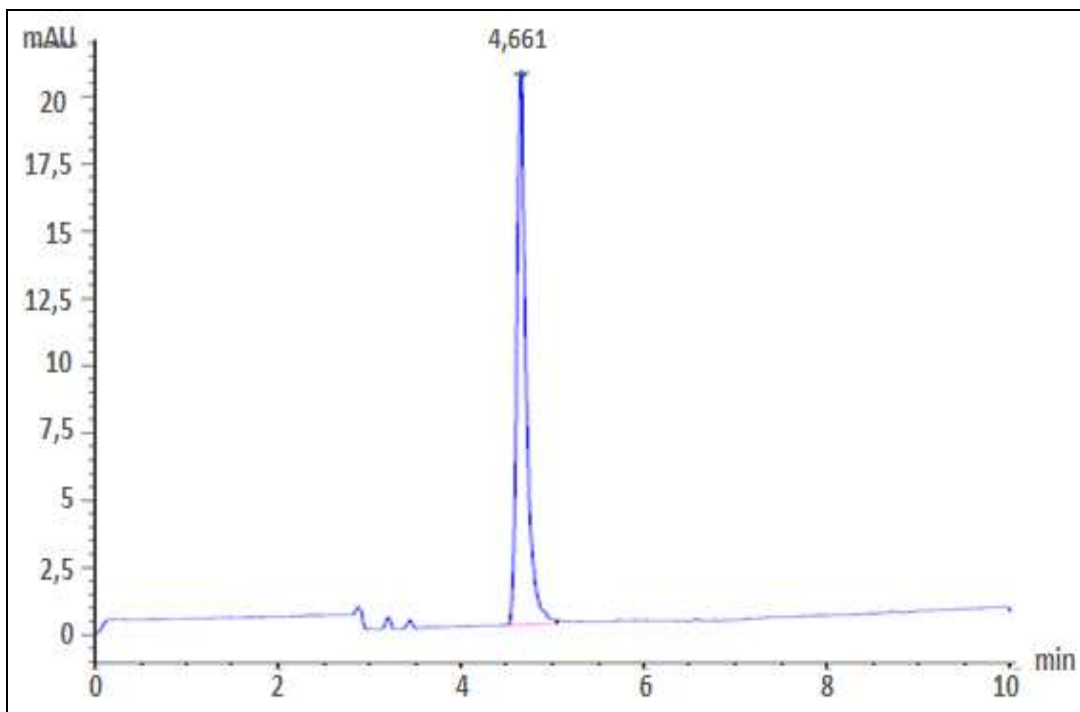


Figura 4.14- Eletroferograma referente à introdução da solução de NANA 500µg/mL em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.

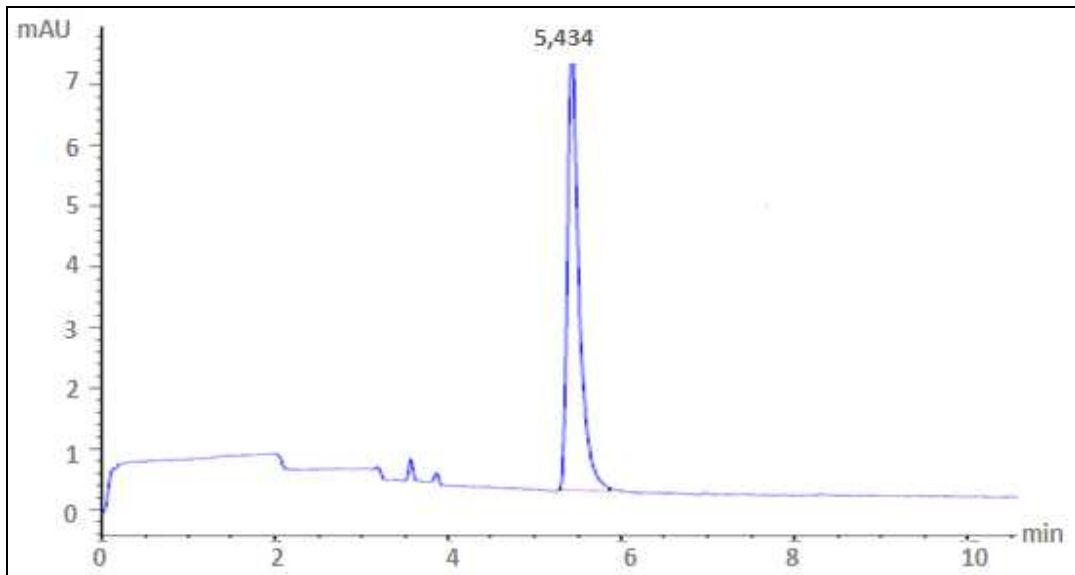


Figura 4.15- Eletroferograma referente à introdução da solução de galactose 500 μ g/mL em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.

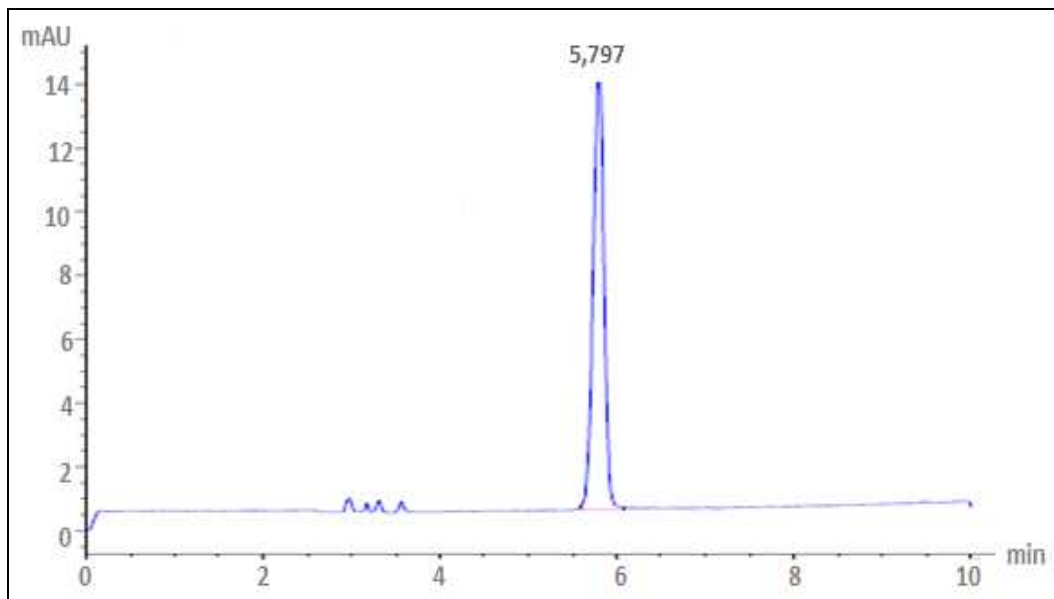


Figura 4.16- Eletroferograma referente à introdução da solução de PSW135 500 μ g/mL em tampão borato 20mM. Condições de análise descritas na Figura 4.13.

A análise realizada para determinar o percentual de pureza do PSW135 foi realizada construindo-se uma curva de calibração utilizando um padrão *in house* de PSW135. A curva de calibração e valores de percentual de pureza são apresentados na Figura 4.17 e Tabela 4.16, respectivamente.

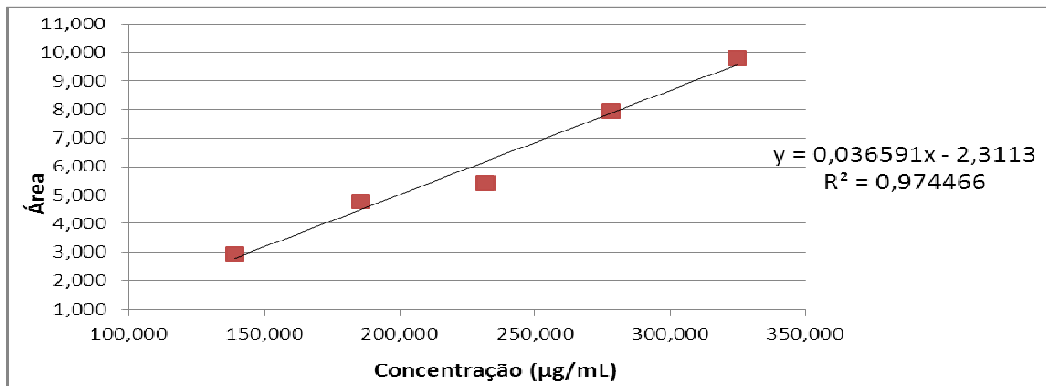


Figura 4.17- Curva de calibração, utilizando um padrão *in house* de PSW135

A Equação 4.1 descreve a reta do gráfico de regressão linear referente ao gráfico da Figura 4.17, onde o coeficiente linear é igual a -2,3113, o coeficiente angular igual a 0,036591 e o coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,974466.

$$y = 0,036591x - 2,3113 \quad (4.1)$$

Tabela 4.16- Percentual de pureza nos lotes de PSW135, determinados por EC utilizando a área normalizada

Eletroforese Capilar		
Lotes	Pureza (%)	
IMW0003	96,69	$\bar{X} = 97,54 \pm 0,81$
	97,63	
	98,31	
IMW0006	94,60	$\bar{X} = 95,46 \pm 0,77$
	96,09	
	95,70	
DF-007W	98,93	$\bar{X} = 99,78 \pm 0,81$
	99,86	
	100,54	
DF-008W	94,14	$\bar{X} = 94,28 \pm 0,20$
	94,42	
	107,21*	

*resultado ignorado em função de ser um dado discrepante à análise. Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

Conforme observado na tabela em questão, o método de EC gerou resultados de pureza para o PSW135 que variam de 94,14% e 100,54%, utilizando a área normalizada. Em função desta normalização, são observados resultados com pouca variação, o que não foi observado quando utilizou-se apenas a área de integração do sinal. Tais resultados indicam que os quatro lotes utilizados no presente estudo apresentam um excelente percentual de pureza e que estariam aprovados pela especificação mínima de pureza exigida pela OMS ($\geq 80\%$). Uma vantagem desta metodologia é a possibilidade de realizar a quantificação da molécula como um polímero, composto de duas unidades monoméricas e não apenas a detecção do monômero NANA, conforme faz o método do resorcinol (UV-Vis).

O Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos já utiliza a EC para a quantificação dos polissacarídeos meningocócicos sorogrupos A, C e W135 presentes no produto final da vacina polissacarídica. Da mesma maneira, Souza (2011) utilizou condições de análises similares empregando a CZE para o desenvolvimento e validação de uma metodologia de quantificação de açúcar livre presente no bulk da vacina conjugada brasileira contra *N.meningitidis* do sorogrupo C, que está sendo desenvolvida por Bio-Manguinhos. Desta forma, esta técnica poderia ser um método alternativo de quantificação do PSW135 enquanto matéria-prima do processo de produção da vacina, após a realização adequada da validação dos parâmetros de análise.

4.5- Avaliação do estudo de pré-validação do método de RMNq de ^1H para o PSW135

O estudo de pré-validação do método proposto foi realizado com base na Resolução – RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos). De acordo com essa resolução, foram realizados ensaios de especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Para tais ensaios foi utilizado um lote de PSW135 (PSW009) e padrão de NANA comercial, como substância de referência, com uma pureza $\geq 95\%$.

4.5.1- Especificidade/seletividade

A especificidade/seletividade foi avaliada através da análise de espectros de RMN de ^1H obtidos, separadamente, do solvente, do padrão interno e da substância de referência (NANA).

Esse ensaio teve como objetivo garantir que os sinais a serem integrados para a quantificação correspondessem apenas aos polissacarídeos sem sobreposição. Os espectros do solvente (Figura 4.18), padrão interno (Figura 4.19) e substância de referência (Figura 4.20) são apresentados a seguir.

Através dos espectros do solvente, padrão interno e substância de referência, foi possível verificar que os sinais presentes em cada um dos espectros não apresentam sobreposição, na região do sinal H-3_{eq}, que é utilizado para a quantificação da pureza do PSW135. Diante do exposto, pode-se dizer que o método apresenta especificidade/seletividade para a identificação e quantificação do PSW135, já que o solvente e o padrão interno não interferem na amostra a ser quantificada.

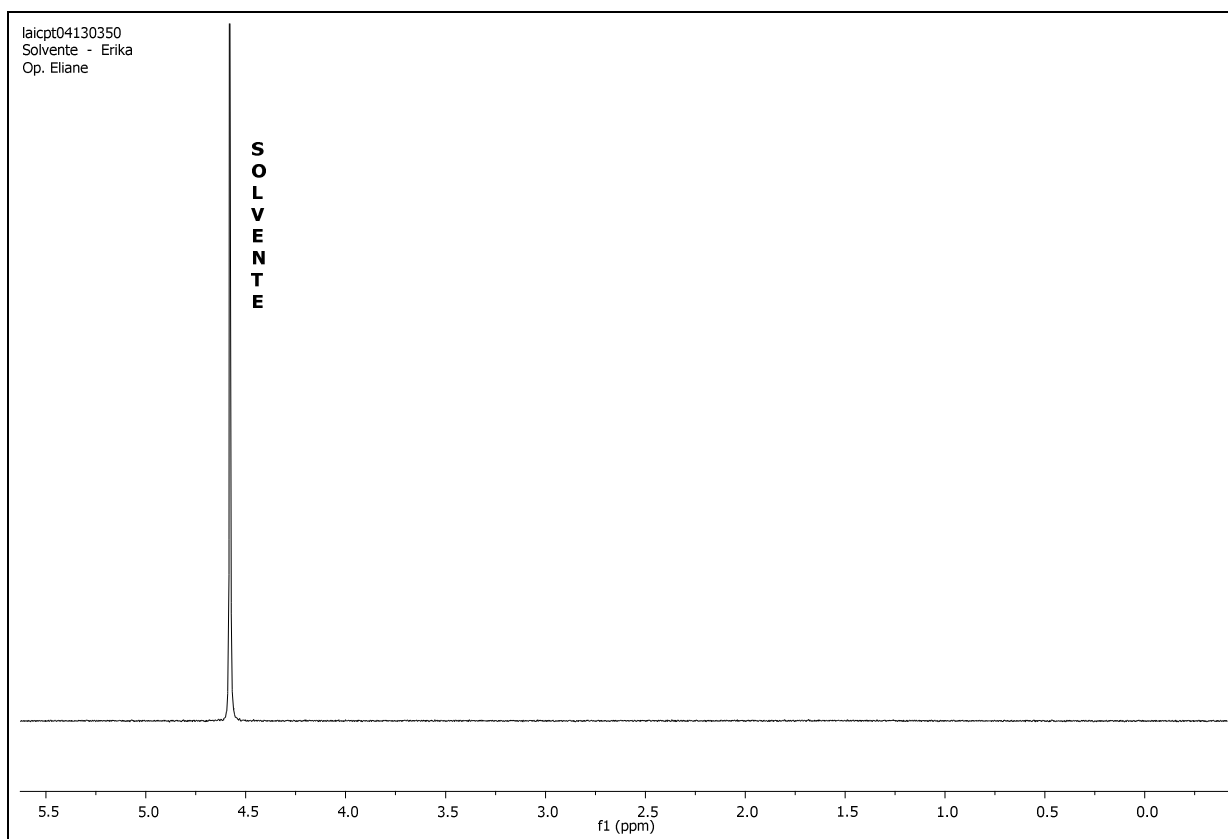


Figura 4.18 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do solvente D_2O .

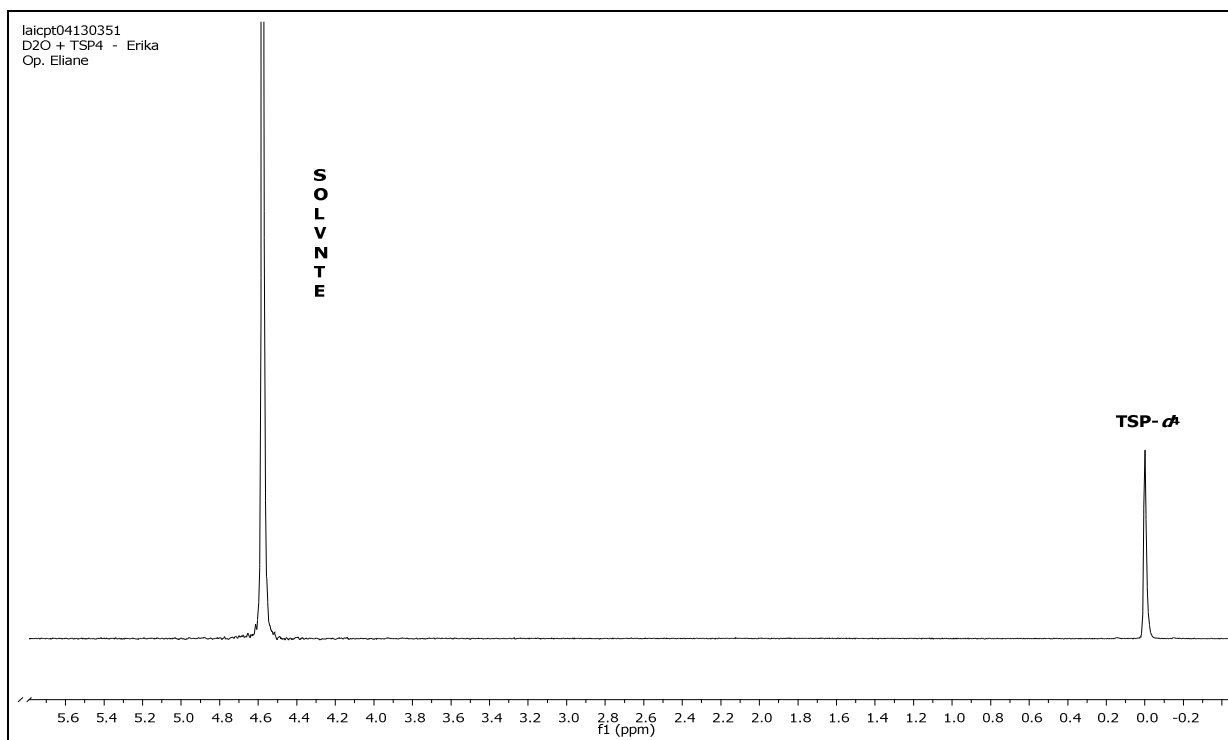


Figura 4.19 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz do padrão interno TSP- d_4 , em D_2O .

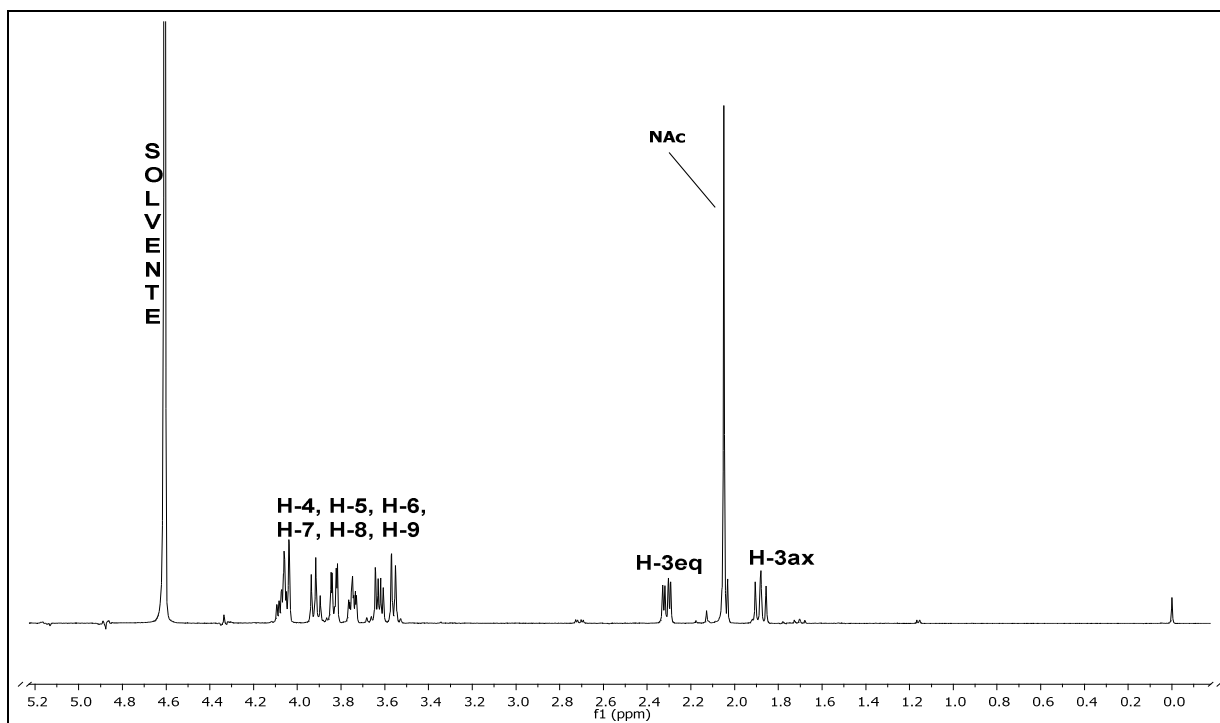


Figura 4.20 - Espectro de RMN de ^1H , 400MHz da substância de referência (NANA) em D_2O .

4.5.2- Linearidade

A linearidade foi avaliada através da análise de cinco diferentes concentrações de uma solução padrão de NANA, usando o sinal H-3eq para a construção da curva. Os resultados estão apresentados a seguir (Tabela 4.17 e Figura 4.21).

Tabela 4.17- Resultados de linearidade da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135.
Valores da Integral de acordo com a concentração da solução de NANA

Ponto	Concentração* (mg/mL)	Integral 1	Integral 2	Integral 3	Integral média
P1	3,99	0,2435	0,2396	0,2373	0,2401
P2	5,44	0,3002	0,3024	0,2997	0,3008
P3	6,76	0,3999	0,3968	0,4004	0,3990
P4	8,21	0,4646	0,4685	0,4803	0,4711
P5	9,46	0,5637	0,5617	0,5640	0,5631

*considerando o valor da massa de padrão NANA pesada e corrigida pela pureza certificada.

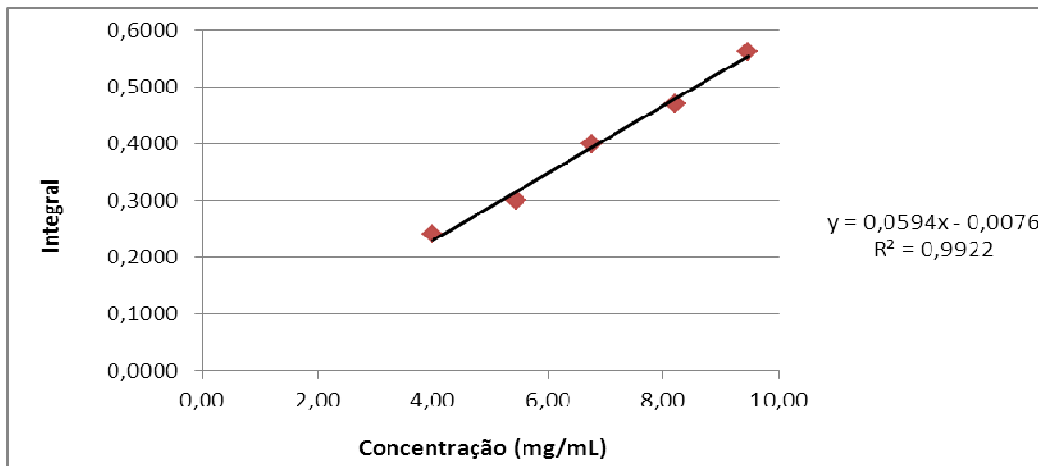


Figura 4.21- Curva padrão de NANA para avaliação do parâmetro de linearidade.

A Equação 4.2 descreve a reta do gráfico de regressão linear construído a partir da curva padrão (Figura 4.21). O coeficiente linear (interseção com o eixo y) é igual a 0,0076, o coeficiente angular igual a 0,0594 e o r igual a 0,9922.

$$y = 0,0594x - 0,0076 \quad (4.2)$$

Com o intuito de avaliar o ajuste da curva (soma residual), os valores de concentração experimental dos pontos da curva foram recalculados através da interpolação da média das integrais medidas na própria curva padrão. Os valores teóricos de concentração dos pontos da curva foram calculados substituindo-se os valores das médias das integrais pelo valor de (x) na Equação 4.2. Os resultados são apresentados na Tabela 4.18.

Conforme observado na Figura 4.21 e dito anteriormente, a curva padrão de NANA resultou em um coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9922. Como o valor obtido foi superior ao critério mínimo de aceitação descrito na RE n° 899 ($r \geq 0,99$), pode-se concluir que o método atendeu ao critério de linearidade. Além disso, o ajuste da curva apresentou um valor de desvio relativo adequado (2,77%), menor que 5%.

Apesar da RE n° 899 exigir o ensaio de linearidade, este parâmetro não seria necessário para os resultados obtidos por RMNq, devido a características específicas do método. Na RMNq a linearidade pode ser considerada intrínseca do método, já que a área do sinal de RMN sempre será proporcional ao número de núcleos que o geraram, ou seja, o sinal gerado sempre será diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.

Tabela 4.18- Avaliação do ajuste da curva padrão de NANA do método de RMNq para quantificação do PSW135.

Pontos	Valor	Valor Real	Valor	(Valor experimental – Valor calculado)	Diferença em módulo	Resíduo percentual (em módulo)
	Nominal (mg/mL)	(corrigido pureza) (mg/mL)	calculado na curva (mg/mL)			
P1	4,16	3,99	4,17	-0,18	0,18	4,51
P2	5,67	5,44	5,19	0,25	0,25	4,65
P3	7,04	6,76	6,85	-0,08	0,08	1,25
P4	8,56	8,21	8,06	0,16	0,16	1,90
P5	9,86	9,46	9,61	-0,14	0,14	1,53
ajuste da curva (soma residual)					0,82	----
média dos desvios relativos (%)						2,77

4.5.3- Precisão

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de repetitividade e precisão intermediária, a qual pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV).

Conforme a ANVISA (2003), os critérios de aceitação podem variar de acordo com o tipo de método e a aplicação do mesmo, não podendo ser maior que 5 %. Desta forma, o critério adotado foi $CV < 5\%$.

4.5.3.1- Repetitividade

A repetitividade foi avaliada através do cálculo do desvio padrão e coeficiente de variação obtido por seis determinações da amostra a 100% da concentração do teste. Os resultados encontram-se na Tabela 4.19.

Conforme observado nesta tabela, foram obtidos resultados de percentual de pureza que variam de 86,01% a 86,92%, e um desvio padrão e CV igual a 0,36 e 0,42%, respectivamente.

O método foi considerado conforme quanto à repetitividade pois o mesmo apresentou um CV menor que 5%.

Tabela 4.19- Resultados de repetitividade da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.

Percentual de pureza do Polissacarídeo meningocócico sorogrupo W135 (%)	
1	86,01
2	86,08
3	86,10
4	86,41
5	86,92
6	86,01
Média	86,26
Desvio Padrão	0,36
Coeficiente de variação (%)	0,42

4.5.3.2- Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através de seis determinações da amostra a 100% da concentração do teste, por dois analistas diferentes, em dias diferentes. Os resultados encontram-se na Tabela 4.20.

Tabela 4.20- Resultados de precisão intermediária da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.

Percentual de pureza do Polissacarídeo meningocócico sorogrupo W135 (%)		
	Analista A	Analista B
	Dia 1	Dia 2
1	86,01	85,94
2	86,08	85,58
3	86,10	85,85
4	86,41	85,60
5	86,92	85,77
6	86,01	85,72
Média de cada analista	86,26	85,74
Desvio padrão de cada analista	0,36	0,14
Coefficiente de variação de cada analista (%)	0,42	0,16
Média total		86,00
Desvio padrão total		0,37
Coefficiente de variação (%)		0,43

Conforme observado nesta tabela, foram obtidos, pelos dois analistas, resultados de percentual de pureza que variam de 85,58% a 86,92%, e um desvio padrão total e CV total igual a 0,37 e 0,43%, respectivamente.

O método foi considerado conforme quanto à repetitividade pois o mesmo apresentou um CV menor que 5%. Pode-se dizer que o método é considerado preciso para a quantificação do PSW135.

4.5.4- Exatidão

A exatidão foi avaliada através da análise de uma substância de referência de pureza conhecida (NANA), a partir de nove determinações, contemplando o intervalo linear, ou seja, utilizando três concentrações diferentes (baixa – 4,29mg/mL; média – 7,14mg/mL; alta –

10,00mg/mL). Para este ensaio, utilizou-se um padrão de NANA de pureza certificada (Sigma Aldrich) igual a 96% e como critério de aceitação um erro menor que 5%. Os resultados são apresentados sob a forma de concentração de NANA (Tabela 4.21) e percentual de pureza do NANA (Tabela 4.22).

Tabela 4.21 - Resultados de exatidão da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, considerando a concentração da solução.

Concentração de NANA (mg/mL)					
Alta 9,46mg/mL		Média 6,76mg/mL		Baixa 3,99mg/mL	
1	9,14	1	6,48	1	3,95
2	9,11	2	6,43	2	3,88
3	9,14	3	6,49	3	3,85
média	9,13	média	6,47	média	3,89
Concentração Real (massa pesada corrigida pureza)	9,46	Concentração Real (massa pesada corrigida pureza)	6,76	Concentração Real (massa pesada corrigida pureza)	3,99
Exatidão	96,48	Exatidão	95,68	Exatidão	97,55
Erro (%)	3,52	Erro (%)	4,32	Erro (%)	2,45

Tabela 4.22- Resultados de exatidão da validação do método de RMNq para quantificação do PSW135, considerando o percentual de pureza do NANA em cada solução.

Percentual de pureza do NANA obtido em 3 diferentes concentrações					
Pureza do padrão NANA 96,00%					
Alta 9,46mg/mL		Média 6,76mg/mL		Baixa 3,99mg/mL	
1	92,71	1	92,05	1	94,96
2	92,38	2	91,34	2	93,44
3	92,76	3	92,17	3	92,54
Média	92,62	Média	91,85	Média	93,65
Exatidão	96,48	Exatidão	95,68	Exatidão	97,55
Erro (%)	3,52	Erro (%)	4,32	Erro (%)	2,45
Média total das 3 concentrações				92,71	
Exatidão utilizando a média total				96,57	
Erro total (%)				3,43	

Conforme observado nas Tabelas 4.21 e 4.22, os resultados se apresentaram de acordo com o esperado (concentração da solução e percentual de pureza). Os valores de erro (%) foram

calculados para as três concentrações, apresentando resultados menores que 5%. O erro calculado, utilizando a média global das três concentrações, também apresentou um valor menor que 5%. Então, pode-se dizer que todos os valores de erros encontrados estão de acordo com o valor de erro aceitável.

Através dos resultados obtidos neste ensaio, pode-se dizer que o método possui uma exatidão adequada para a quantificação da pureza do PSW135.

4.5.5- Intervalo

O intervalo do método foi avaliado de acordo com os critérios de aceitação para linearidade, exatidão e precisão.

Através destes resultados, pode-se dizer que os valores encontrados estão dentro do intervalo estabelecido pela curva padrão de NANA, onde o menor ponto é igual a 4,29mg/mL e o maior igual a 10,0mg/mL.

4.5.6- Robustez

A robustez foi avaliada através da variação da temperatura e número de varredura no momento da aquisição dos espectros.

Tabela 4.23- Resultados de obtidos pela variação da temperatura de aquisição dos espectros de RMNq de ¹H para quantificação do PSW135, utilizando lote PSW009.

Temperaturas (K)	Pureza (%)			média
	1	2	3	
303	84,83	84,75	85,31	84,96
313	88,35	88,30	88,56	88,40
323	88,01	87,45	87,76	87,74

Conforme observado na Tabela 4.23, os resultados de pureza do PSW135 obtidos com a variação da temperatura de aquisição apresentaram-se entre 84,75% e 88,56%. Pode-se observar que resultados mais baixos, com média de 84,96% foram obtidos utilizando-se uma temperatura igual a 303K. Tais resultados apresentam uma diferença em torno de 3,9% da média dos resultados obtidos a 313K (temperatura de análise), pois à 303K os espectros apresentam baixa

resolução dos sinais. Isso não é observado nos resultados obtidos a 323K, que apresentam uma variação de 0,8% quando comparados aos resultados obtidos a 313K.

Na Tabela 4.24, os resultados de pureza do PSW135 obtidos com a variação do número de varreduras da aquisição apresentaram-se entre 81,60% e 88,56%. Observam-se resultados mais baixos, com média de 82,17% quando espectros foram obtidos utilizando-se um ns igual a 32. Esses resultados apresentam uma diferença de 7,1% em torno da média dos valores obtidos por um ns de 64 indicando que tal valor de ns influencia no resultado obtido. Quando comparamos os resultados obtidos com ns 128, observamos uma diferença de 1,0% em torno da média, utilizando ns 64, sugerindo que esse valor de ns não influencia nos resultados obtidos.

Através de uma avaliação global pode-se dizer que a temperatura de 303K e o número de varredura igual a 32 apresentam uma interferência nos resultados obtidos, o que não foi observado nos outros valores de parâmetros alterados. Devido a estas interferências, tais parâmetros devem ser cuidadosamente controlados para não originarem resultados pouco confiáveis na quantificação do PSW135. As variações realizadas no método foram grandes (variação de 10 graus na temperatura e de 32 a 64 no ns), porém nos ensaios de validação do método, devem-se testar pequenas variações de temperatura e ns. Através destas pequenas variações será possível determinar o limite de temperatura e ns que o método é capaz de suportar, sem que haja interferência ns resultados (ANVISA, 2003; Xu et al., 2005b).

Tabela 4.24- Resultados de obtidos pela variação do número de varredura da aquisição dos espectros de RMNq de ^1H para quantificação do PSW135.

Número de varredura	Pureza (%)			média
	1	2	3	
32	82,43	82,48	81,60	82,17
64	88,35	88,30	88,56	88,40
128	87,58	87,35	87,60	87,51

Através do estudo de pré-validação foi possível verificar que o método de RMNq de ^1H desenvolvido é adequado para identificar e quantificar a pureza do PSW135, segundo os limites dos parâmetros de validação estabelecidos pela ANVISA (2003). Posteriormente será realizado o estudo de validação para a quantificação da pureza e conteúdo de OAc do PSC e os cálculos de incerteza dos resultados obtidos para ambos sorogrupos.

4.6- Comparação estatística dos métodos RMNq, UV-Vis e EC

Após a determinação da pureza e teor de grupos OAc dos PSC e PSW135 por diferentes métodos de análise, comparou-se os resultados obtidos. No PSC, o percentual médio de pureza obtida por RMN é de 83,93%, enquanto para o método de UV-Vis é de 82,48%, similar ao resultado de RMN (Tabela 4.25). A análise estatística mostra que existem diferenças significativas ($p < 0,001$) no percentual de pureza do PSC entre os dois métodos, visto que não ocorre interseção entre os intervalos de confiança obtidos. Entretanto, pode-se observar que os resultados do método UV-Vis apresentarem uma maior variação (Figura 4.22).

Por outro lado, os valores encontrados para o teor de grupos OAc pelos dois métodos não apresentam similaridades. Segundo os dados obtidos por RMN o PSC encontra-se com um maior teor de grupos OAc (2,30 $\mu\text{mol/mg}$) do que o encontrado no método de UV-Vis (1,88 $\mu\text{mol/mg}$) (Tabela 4.25).

Tabela 4.25- Resultados de PSC obtidos por RMN e UV-Vis

Lote	RMN (GARP)				UV-Vis			
	Pureza (%)		OAc ($\mu\text{mol/mg}$)		Pureza (%)		OAc ($\mu\text{mol/mg}$)	
IMC0011	82,40	$\bar{X} = 82,34 \pm 0,16$	2,23	$\bar{X} = 2,23 \pm 0,01$	80,60	$\bar{X} = 82,30 \pm 1,70$	1,72	$\bar{X} = 1,79 \pm 0,12$
	82,46		2,24		84,00		1,73	
	82,15		2,23		82,30		1,93	
IMC0013	84,90	$\bar{X} = 84,81 \pm 0,10$	2,63	$\bar{X} = 2,61 \pm 0,04$	81,90	$\bar{X} = 81,00 \pm 0,95$	2,12	$\bar{X} = 2,01 \pm 0,10$
	84,82		2,57		80,00		1,99	
	84,71		2,64		81,10		1,92	
IMC0018	88,89	$\bar{X} = 88,38 \pm 0,51$	2,28	$\bar{X} = 2,27 \pm 0,01$	80,60	$\bar{X} = 80,60 \pm 0,70$	1,74	$\bar{X} = 1,75 \pm 0,01$
	88,38		2,27		81,30		1,76	
	87,87		2,26		79,90		1,76	
IMC1001	80,26	$\bar{X} = 80,20 \pm 0,61$	2,07	$\bar{X} = 2,08 \pm 0,02$	84,00	$\bar{X} = 86,03 \pm 1,80$	1,98	$\bar{X} = 1,98 \pm 0,05$
	79,56		2,07		87,40		1,93	
	80,77		2,11		86,70		2,03	

Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

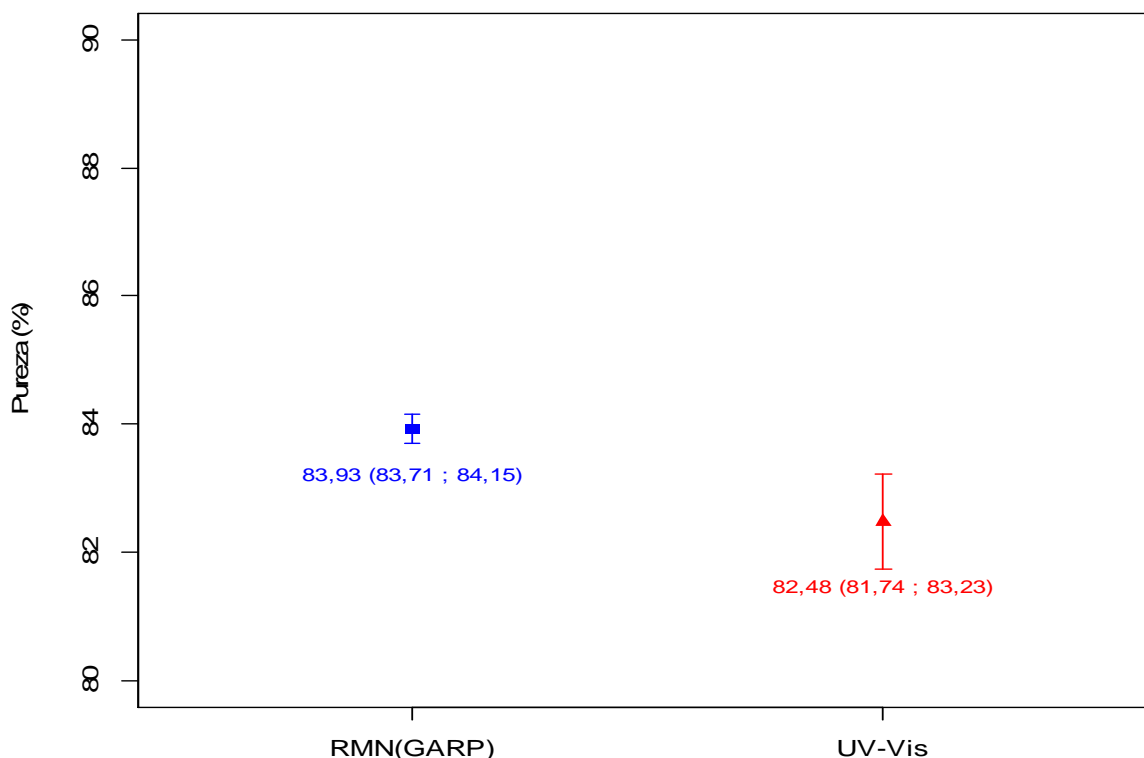


Figura 4.22 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados de pureza obtidos pelos métodos de RMN x UV-Vis do PSC.

Contudo, o teor do grupo OAc apresenta diferenças significativas ($p < 0,001$) entre os métodos utilizados. Os resultados do método de RMNq indicam que o PSC está 22% mais acetilado, em relação ao resultado obtido pelo método de UV-Vis. A diferença entre os dois métodos pode estar associado ao fato da técnica de RMN permitir a quantificação direta do núcleo em estudo no analito, enquanto no UV-Vis o método é inespecífico, indireto e utiliza uma curva de calibração de substância de referência para cálculo da concentração do grupo em questão (Figura 4.23). Estudos complementares poderiam ser realizados para verificar quais resultados seriam mais confiáveis, incluindo o cálculo do percentual de *O*-acetilação da molécula analisada.

A análise do percentual de pureza obtido para os lotes do PSW135 por RMN (GARP) apresentou valores discrepantes aos outros métodos, com média 82,29%, inferior aos resultados encontrados na EC e UV-Vis, que apresentaram média aproximada de 95,66%. Além disso, o lote IMW0006 apresentou valores de pureza em torno de 67,25%, que impactou na média global do método (Tabela 4.26).

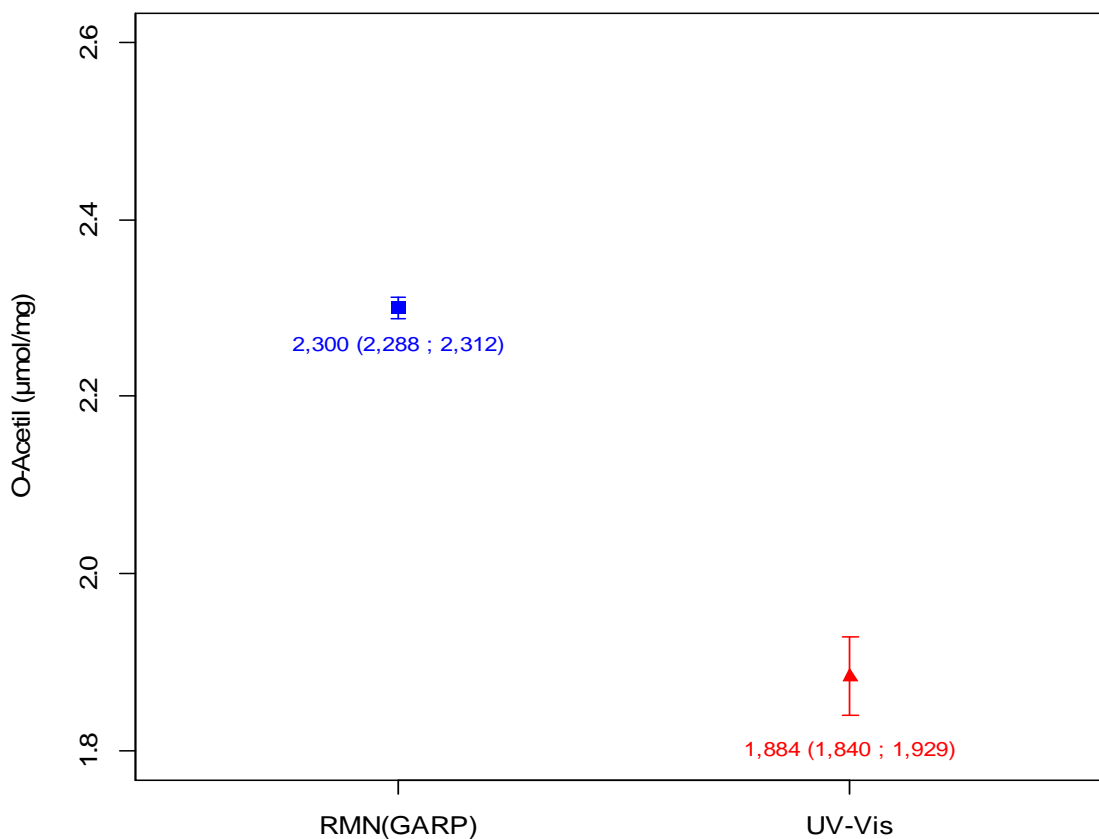


Figura 4.23 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados de teor de grupos OAc obtidos pelos métodos de RMN x UV-Vis do PSC.

Tabela 4.26- Resultados de PSW135 obtidos por RMN, UV-Vis e EC

Lote	Pureza (%)					
	RMN (GARP)		EC		UV-Vis	
IMW0003	89,36	$\bar{X} = 90,02 \pm 0,58$	96,69	$\bar{X} = 97,54 \pm 0,81$	90,85	$\bar{X} = 91,17 \pm 1,00$
	90,25		97,63		92,30	
	90,46		98,31		90,37	
IMW0006	67,63	$\bar{X} = 67,25 \pm 0,45$	94,60	$\bar{X} = 95,46 \pm 0,77$	99,05	$\bar{X} = 97,61 \pm 1,53$
	67,37		96,09		97,77	
	66,76		95,70		96,00	
DF-007W	83,53	$\bar{X} = 82,96 \pm 0,92$	98,93	$\bar{X} = 99,78 \pm 0,81$	94,38	$\bar{X} = 94,71 \pm 0,29$
	81,89		99,86		94,87	
	83,45		100,54		94,89	
DF-008W	88,98	$\bar{X} = 88,94 \pm 0,16$	94,14	$\bar{X} = 94,28 \pm 0,20$	94,83	$\bar{X} = 94,72 \pm 0,10$
	89,08		94,42		94,65	
	88,77		---		94,67	

*resultado ignorado em função de ser um dado discrepante à análise. Resultados expressos em média (\bar{X}) \pm desvio padrão.

A avaliação estatística do percentual de pureza do PSW135 mostrou que o método de EC apresentou a maior variação nos resultados. De acordo com a Figura 4.24, foram observadas diferenças significativas entre os três métodos ($p < 0,001$), já que os intervalos de confiança não se sobrepõem. Apesar das diferenças observadas, todos os métodos poderiam ser utilizados para a quantificação do PSW135, pois geraram resultados de acordo com o esperado.

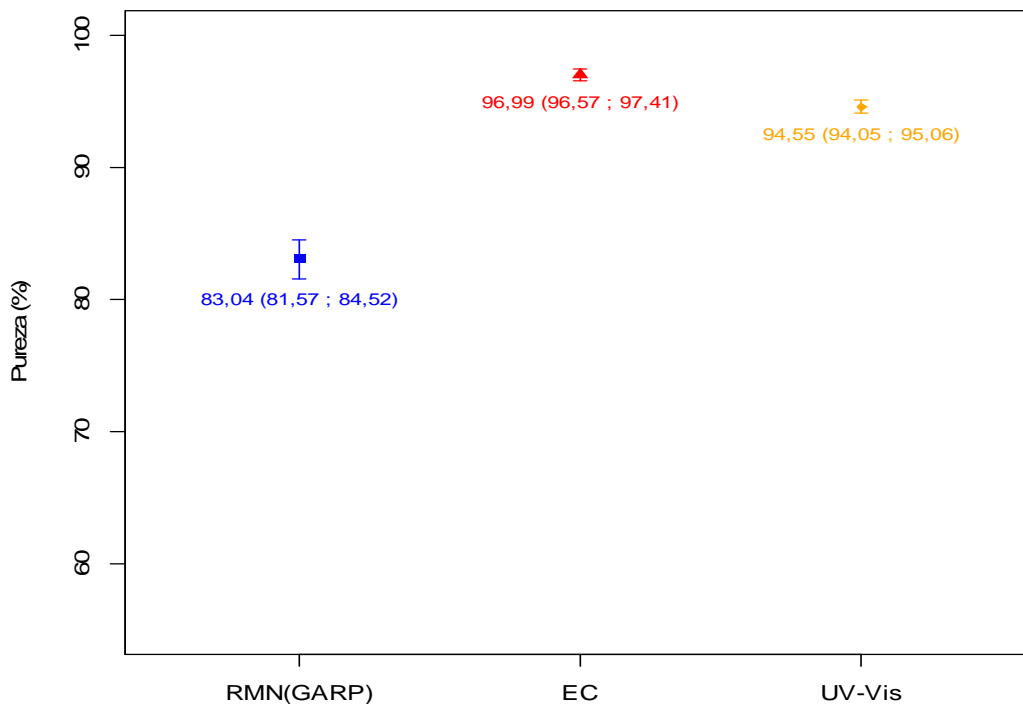


Figura 4.24 – Gráfico de erro para avaliação e comparação dos resultados do percentual de pureza do PSW135 obtidos pelos métodos de RMN, UV-Vis e EC.

Os resultados apresentados no presente estudo, mostraram que as três técnicas (RMNq, EC e UV-Vis) podem ser utilizadas no controle de qualidade do PSC e PSW135. A EC se mostrou mais vantajosa em relação à UV-Vis, já que utiliza uma menor quantidade de amostra e tempo de análise relativamente curto, com um preparo de amostra menos demorado, além de ser capaz de identificar e quantificar o polissacarídeo em uma única análise. Porém, a EC necessita utilizar um padrão com estrutura igual ao analito, além da construção de uma curva de calibração. Neste sentido, a RMNq apresenta-se mais vantajosa que a UV-Vis e a EC, já que não necessita da utilização de um padrão com estrutura igual ao analito e construção de uma curva de calibração, pois utiliza medida direta (padrão interno x analito) (Tabela 4.27).

Em função das vantagens apresentadas e da vasta utilização, descrita na literatura, da técnica de RMN no controle de qualidade de polissacarídeos bacterianos com potencial vacinal, Bio-Manguinhos tem demonstrado interesse em adquirir um equipamento de RMN. Entretanto, antes da aplicação da metodologia proposta, no controle de qualidade de rotina do PSW135, novos ensaios de validação utilizando a galactose como substância de referência são necessários para a confirmação do melhor sinal a ser utilizado na quantificação. Em relação à quantificação do PSC, é necessária a realização de estudos de validação antes da introdução do método.

Tabela 4.27 – Comparação entre os métodos de RMNq, EC e UV-Vis.

	RMNq	EC	UV-Vis
Quantidade de amostra	7mg	10mg	100mg
Tempo estimado de análise	40 min	30 min	2 horas
Curva de calibração	Não	Sim	Sim
Padrão com estrutura igual ao analito	Não	Sim	Sim
Preparo da amostra	Rápido Dissolver em solvente deuterado	Médio Dissolver em tampão, realizar diluição e filtrar	Demorado Dissolver em água, realizar diluições e adicionar reagentes para formar colorações
Identificação e quantificação em uma única análise	Sim	Sim	Não
Avalia a molécula como um todo	Sim	Sim	Sim para o PSC Não para o PSW135

5- CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que é possível utilizar o método de RMNq para identificar e determinar a pureza dos polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135, em um único espectro de RMN de ^1H . Os seguintes pontos devem ser destacados:

- O método proposto possibilitou a avaliação da identidade do PSC e PSW135;
- Os parâmetros de aquisição dos espectros quantitativos foram: $d_1 = 25\text{seg}$; $n_s = 64$ e $T = 313\text{K}$;
- O tempo de análise do método desenvolvido foi de 35 minutos, inferior ao método de UV-Vis;
- O quantitativo de amostra utilizado é inferior ao método de UV-Vis;
- Preparo rápido de amostra, com pouca manipulação da mesma;
- Utilização de padrão interno de concentração conhecida, sem necessidade de estrutura idêntica ao analito e construção de uma curva de calibração;
- A manipulação de soluções aquosas não traz nenhum risco ambiental ou toxicológico para os analistas, o que não ocorre no método de UV-Vis.

O método de EC demonstrou-se adequado para identificar e determinar o percentual de pureza do PSW135. Esse método necessita ser validado, e caso atenda todos os parâmetros, pode ser utilizado como um método alternativo no controle de qualidade do PSW135.

O estudo de pré-validação do método de RMNq desenvolvido, para identificar e determinar a pureza do PSW135, gerou resultados satisfatórios de acordo com os limites preconizados na norma estabelecida pelo órgão competente. Entretanto, o método necessita de pequenos ajustes para ser introduzido na rotina de controle de qualidade dos polissacarídeos meningocócicos, utilizados na produção das vacinas meningocócicas polissacarídicas e conjugadas em Bio-Manguinhos. A utilização da RMNq no controle destas moléculas poderá trazer benefícios à Instituição, já que o mesmo propiciará a realização dos testes de identidade, quantificação de pureza e teor de grupos OAc em uma única análise.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R.J.; Byrne J.J.; Griffiths, L.; Perez, M. **¹H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on ¹H chemical shifts.** Magn. Reson. Chem. 44 (2006) 491–509.

Altria, K.D. **Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography.** Journal of Chromatography A, 1999; 856: 443–463.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução N° 899. Brasília: 2003; 1-12.

ANVISA. **Registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos.** Resolução-RDC N° 55. Brasília: 2010; 1-16.

Barbosa, A.P.R. **A Formação de Competências para Inovar através de Processos de Transferência de Tecnologia: um estudo de caso.** Rio de Janeiro; 2009. Doutorado [Tese em Processos Químicos e Bioquímicos] – Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bardotti, A.; et al. **Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines against *Neisseria meningitidis* groups Y and W135.** Vaccine, 2005; 23: 1887–1899.

Bardotti, A.; et al. **Physicochemical characterisation of glycoconjugate vaccines for prevention of meningococcal diseases.** Vaccine, 2008; 26: 2284—2296.

Bastos, R.C. **Síntese, Purificação e Caracterização Físico-Química do Conjugado de Polissacarídeo Meningocócico C com Anatoxina Tetânica.** Rio de Janeiro; 2005. Mestrado [Dissertação em Tecnologia de Imunobiológicos] – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Bharti, S.K. & Roy, R. **Quantitative ^1H NMR spectroscopy.** Trends in analytical Chemistry, 2012; 35, 5-26.

Bhattacharjee, A.K.; Jennings, H.J.; Kenny, C.P.; Martin, A. & Smith, I.C.P. **Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance.** J. Biol. Chem., 1975; 250: 1926-1932.

Bio-Manguinhos. **Determinação de ácido siálico.** Instrução de Trabalho - IT N° 0717. Documento Interno. Revisão 04. Rio de Janeiro: 2010

Bio-Manguinhos. **Determinação de O-acetil no polissacarídeo meningocócico tipo A e/ou C.** Instrução de Trabalho - IT N° 1585. Documento Interno. Revisão 03. Rio de Janeiro: 2011.

Bio-Manguinhos. **Determinação quantitativa dos polissacarídeos a, c e w no produto final, vacina meningocócica acw (polissacarídica) por eletroforese capilar.** Instrução de Trabalho - IT N° 6012. Documento Interno. Revisão 03. Rio de Janeiro: 2011.

Borges M.D.N. **Avaliação dos métodos espectroscópicos UV-Vis e RMN de H^1 para quantificação da pureza e do teor de O-acetilação de polissacarídeos meningocócicos A.** Rio de Janeiro; 2009. Mestrado [Dissertação em Engenharia Química] – Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Borrow, R.; Goldblatt, D.; Andrews, N.; Richmond, P.; Southern, J. & Miller, E. **Influence of prior meningococcal C polysaccharide vaccination on the response and generation of memory after meningococcal C conjugate vaccination in young children.** J. Infect. Dis., 2001; 184: 377-380.

Bröker, M.; Dull, P.M.; Rappuoli, R. & Costantino, P. **Chemistry of a neww investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages.** Vaccine, 2009; 27: 5574-5580.

Bröker, M. & Veitch, K. **Quadrivalent meningococcal vaccines: Hyporesponsiveness as an important consideration when choosing between the use of conjugate vaccine or polysaccharide vaccine.** Travel Medicine and Infectious Disease, 2010; 8: 47-50.

Bundle, D.R.; Smith, I.C. & Jennings, H.J. **Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X.** J. Biol. Chem., 1974; 249: 2275-2281.

Bussab, W.O. & Morettin, P.A. **Estatística Básica.** 5ª edição. Editora Saraiva, São Paulo, 2002.
Cartwright, K. **Introduction and historical aspects.** In: **Meningococcal Disease.** Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.1-19.

Chang, Q.; Tzeng, Y.L. & Stephens, D.S. **Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention.** Clinical Epidemiology, 2012; 4: 237-245.

Conference report. **Workshop on vaccine pressure and *Neisseria meningitidis*, Annecy, France, 9-11 March 2005.** Vaccine, 2007; 25: 4125-4129.

Core Team. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2012.

Cuello, M.; et al.. **New meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate Physico-chemical and immunological characterization.** Vaccine, 2007; 25: 1798–1805.

Difabio J.L. **Polisacáridos capsulares como vacunas antibacterianas.** Adel. Microbiol. Enf. Infecc. 1988; 7: 1-18.

Donaldson, L.; Moores, Y. & Howe, J. **Introduction of immunization against group C meningococcal Infection.** Londres: Departament of Health, Report n. PL/CMO/99/2, 1999.

Farmacopéia Brasileira. 5ª Edição, Volume 1, Atheneu Editora São Paulo Ltda., Brasília, 2010, p. 53.

Farmacopéia Européia 5ª ed. 2005; v.1: p. 682-683.

Frasch, C.E. **Production and control of *Neisseria meningitidis* vaccines.** In: Bacterial Vaccines, 1990; New York Alan R. Liss.

Garrido, R.; et al.. **Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance evaluation and total assignment of the capsular polysaccharide *Neisseria meningitidis* serogroup X.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012; 70: 295– 300.

Girard M.P.; Preziosi M.P.; Aguado M.T. & Kieny M.P. **A review of vaccine research and development: Meningococcal disease.** *Vaccine* 2006; 24: 4692-4700.

Goldschneider, I.; Gotschlich, E.C. & Artenstein, M.S. **Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state.** *The Journal of Experimental Medicine*, 1969; 129, 1385-1395.

Gotschlich, E.C., Liu, T.Y. & Artenstein, M.S. **Human immunity to the meningococcus. III-Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides.** *J.Exp. Med.*, 1969; 129: 1349-1365.

Gudlavalleti, S.K.; Lee, C.H.; Norris, S.E.; Satyaseela, M.P.; Vann, W.F. & Frasch, C.E. **Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide.** *Vaccine*, 2007; 25:7972-7980.

Halperin, S.A.; et al.. **The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease.** *Vaccine*, 2011; doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.032.

Harrison, L.H.; Trotter, C.L. & Ramsay, M.E. **Global epidemiology of meningococcal disease.** *Vaccine*, 2009; 27S: B51-B63.

Henriques, A.W.S.; Jessouroun, E.; Lima, E.L. & Alves, T.L.M. **Capsular polysaccharide production by *Neisseria meningitidis* serogroup C: Optimization of process variables using response surface methodology.** *Process Biochemistry*, 2006; 41: 1822-1828.

Hestrin, S. **The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application.** *The Journal of Biological Chemistry*, p. 249-261, 1949.

Hobb, R.I.; Tzeng, Y.L.; Choudhury, B.P.; Carlson, R.W. & Stephens, D.S. **Requirement of NMB0065 for connecting assembly and export of siálico acid capsular polysaccharides in *Neisseria meningitidis*.** *Microbes and Infection*, 2010; 12: 476-487.

Holzgrabe, U. **Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications**. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2010; 57: 229-240.

Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, B. & Waibel, B. **Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005; 38: 806-812.

Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**, 2008; Amsterdam: Elsevier.

Inmetro. DOQ-CGCRE-088 - **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 3, Rio de Janeiro: 2010.

Jennings, H.J. **Capsular polysaccharides as human vaccines**. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 1983; 41: 155-208.

Jennings, H.J. & Lugowski, C. **Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates**. Journal of Immunology, 1981; 127: 1011-1018.

Jessouroun E., Silveira I.A.F.B., Bastos R.C., Frasc C.E., Lee C.H. **Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines**. International Publication WO 2005/037320; 2005.

Jodar, L.; Griffiths, E. & Feavers, I. **Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines**. Vaccine, 2004; 22: 1047-1053.

Jones C. & Lemercinier X. **Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from Neisseria meningitidis used in vaccine manufacture**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis 2002; 30: 1233-47.

Jones, C. **NMR assays for carbohydrate-based vaccines**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005; 38: 840-850.

Joshi, V.S.; Bajaj, I.B.; Survase, S.A.; Singhal, R.S. & Kennedy, J.F. **Meningococcal polysaccharide vaccines: a review**. Carbohydrate Polymers 2009; 75: 553-565.

Kannamkumarath, S.S.; Wrobel; K.; Wrobel; K.; B'Hymer, C. & Caruso, J.A. **Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis.** *Journal of Chromatography A*, 2002; 975: 245–266.

Kao, G. & Tsai, C.M. **Quantification of O-acetyl, N-acetyl and phosphate groups and determination of the extent of O-acetylation in bacterial vaccine polysaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with conductivity detection (HPAEC-CD).** *Vaccine*, 2004; 22: 335-344.

Koppes, G.M.; Ellenbogen, C. & Gebhart, R.J. **Group Y meningococcal disease in United States Air Force recruits.** *The American Journal Medicine*, 1977; 62: 661-666.

Laforce, F.M.; Ravenscroft, N.; Djingareyc, M. & Viviania, S. **Epidemic meningitis due to Group A *Neisseria meningitidis* in the African meningitis belt: A persistent problem with an imminent solution.** *Vaccine*, 2009; 27S, B13-B19.

Lamb DH, Summa L, Lei QP, Duval G, Adam O. **Determination of free carrier protein in protein-polysaccharide conjugate vaccines by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromat*, 2000.

Lamb, D.H.; Lei, Q.P.; Hakim, N.; Rizzo, S. & Cash, P. **Determination of meningococcal polysaccharides by capillary zone electrophoresis.** *Analytical Biochemistry*, 2005; 338: 263–269.

Lee, C.J. **Bacterial capsular polysaccharides – Biochemistry, immunity and vaccine.** *Molecular Immunology*, 1987; 24: 1005-1019.

Lee CH, Frasch CE. **National Institute of Health. Polysaccharide-protein conjugate vaccines.** Patent pending, US 60/493, 389; WO 2005/014,037 A2, 2005.

Lemercinier X. & Jones C. **Full ¹H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production.** *Carbohydrate Research*, 1996; 296: 83-96.

Lemos, A.P.S. **Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo C, Grande São Paulo, 1990 a 2003.** São Paulo; 2005. Doutorado [Dissertação em Farmácia] – Universidade de São Paulo.

Longworth, E.; et al.. **O-acetylation status of the capsular polysaccharides of serogroup Y and W135 meningococci isolated in the UK.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2002; 32: 119-123.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farral, A.L. & Randall, R.H. **Protein measurement with Folin phenol reagent.** J Biol Chem, 1951; 193: 165.

Malz F. & Jancke, H. **Validation of quantitative NMR.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005; 38: 813-23.

Martino, M.M. & Holzgrabe, U. **NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011; 55: 1-15.

Michaleas, S. & Antoniadou-Vyza, E. **A new approach to quantitative NMR: Fluoroquinolones analysis by evaluating the chemical shift displacements.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008; 42(4): 405-410.

Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6. ed., Brasília: Secretaria de Vigilância Sanitária, 2005.

Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 7. ed., Brasília: Secretaria de Vigilância Sanitária, 2009.

Morley, S.L. & Pollard, A.J. **Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon?** Vaccine, 2002; 20, 666-687.

Noronha, C.P.; Struciner, C.J. & Halloran, M.E. **Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case control study.** International Journal of Epidemiology, 1995; 24, 1050-1057.

Pauli, G. F.; Jaki, B. U. & Lankin, D. C. **A Routine Experimental Protocol for qHNMR Illustrated with Taxol.** Journal Naural Prod., 2007; 70: 589-595.

Pavia, D.; Lampman, G. & Kriz, G. **Introduction to spectroscopy**, 3. ed., 2001; Philadelphia: Brooks/Cole.

Pollard, A.J. **Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2004; 23, S274-S279,.

Pollard, A.J. & Frasch, C.E. **Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*.** *Vaccine*, 19, 1327-1346, 2001.

Poolman, J.T.; Van der Ley, P.A. & Tommassen, J. **Surface structures and secreted products of meningococci.** In: **Meningococcal Disease.** Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.21-34.

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. & Melo, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Quimica Nova*, 2004; 27(5): 771-780.

Richmond, P., et al. **Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine.** *J. Infect. Dis.*, 2000a; 181: 761-764.

Richmond, P., et al. **Safety and immunogenicity of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults.** *Vaccine*, 2000b; 18: 641-646.

Riedo, F.X.; Plikaytis, B.D. & Broome, C.V. **Epidemiology and prevention of meningococcal disease.** *Journal Pediatric Infectious Diseases*, 1995; 14: 643-657.

Rocha, F.R.P. & Teixeira, L.S.G. **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis.** *Quimica Nova*, 2004; 27(5): 807-812.

Rosenstein, N.E.; Perkins, B.A.; Stephens, D.S.; Popovic, T. & Hughes, J. M. **Meningococcal Disease.** *The New England Journal of Medicine*, 2001; 344: 1378-1388.

Sáfadi M.A.P.; Barros A.P. **Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations.** *Jornal de Pediatria*, 2006; 82(3): 35-44a.

Sáfadi, M.A.P.; et al.. **The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945–2010: an unpredictable and changing landscape.** *Epidemiology and Infection*, 2012; 1-12b.

Sáfadi, M.A.; Berezin, E.M.; Oselka, G.W. **A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines.** *Jornal da Pediatria*, 2012; 88(3):195-202.

Santos, M.S. & Colnago, L.A. **Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas.** *Química Nova*, 2013; 36 (2): 324-330.

Scherp, H.W. & Rake, G. **Studies on meningococcal infection. XIII. Correlation between antipolysaccharide and the antibody which protects mice against infection with type I meningococci.** *J. Exp. Med.*, 1945; 81: 85-92.

SciencePhoto.2012 [online]. [Capturado em 02/01/2012]; Disponível em <http://www.sciencephoto.com/media/11662/enlarge>.

Silveira, I.A.F.B. **Obtenção, caracterização físico-química e avaliação imunológica de vacinas conjugadas de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com toxóide tetânico.** Rio de Janeiro; 2007. Doutorado [Tese em Imunologia] – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Silveira, I.A.F.B. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** *Vaccine*, 2007; 25: 7261–7270.

Soininen, P. **Quantitative ¹H NMR Spectroscopy Chemical and Biological Applications.** Kuopio; 2008. Doutorado [Tese em Ciências Naturais e Ambientais] – Universidade de Kuopio.

Souza, M.I. **Separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres na vacina meningocócica C conjugada brasileira utilizando eletroforese capilar.** Rio de Janeiro; 2011. Mestrado [Dissertação em Tecnologia de Imunobiológicos] – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Stephens, D.S.; Greenwood B. & Brandtzaeg, P. **Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis.** *Lancet*, 2007; 369: 2196-2210.

Swartley, J. S.; et al.. **Capsule switching of Neisseria meningitidis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences – USA*, 1997; 94, 271-276.

Svennerholm, L. **Quantitative estimation of sialic acids.** *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604-611, 1957.

Taha, M.K.; Giorgini, D. & Ducos-Galand, M. **Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42, 4158-4163.

Tavares, M.F.M. **Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.** *Química Nova*, 1996; 19 (2): 173-181.

Tzeng, Y.L. & Stephens, D.S. **Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*.** *Microbes and Infection*, 2000; 2: 687-700.

Verheul, A.F.M.; Snippe, H. & Poolman, J.T. **Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component.** *Microbiol. Rev.*, 1993; 57: 34-49.

Vipond, C.; et al. **Evaluation of a candidate International Standard for Meningococcal Group C Polysaccharide.** *Biologicals*, 2012; 40: 353-363.

Xu, Q.; et al. **Characterization and quantification of C-polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide preparations.** *Analytical Biochemistry*, 2005a; 336: 262-272.

Xu, Q.; et al. **Quantitative nuclear magnetic resonance analysis and characterization of the derivatized *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide intermediate for PedvaxHIB.** *Analytical Biochemistry*, 2005b; 337: 235-245.

Weidlich, L.; et al.. **High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5, 2:ST-11 clone in Southern Brazil.** *Journal of Infection*, 2008; 57: 324-331.

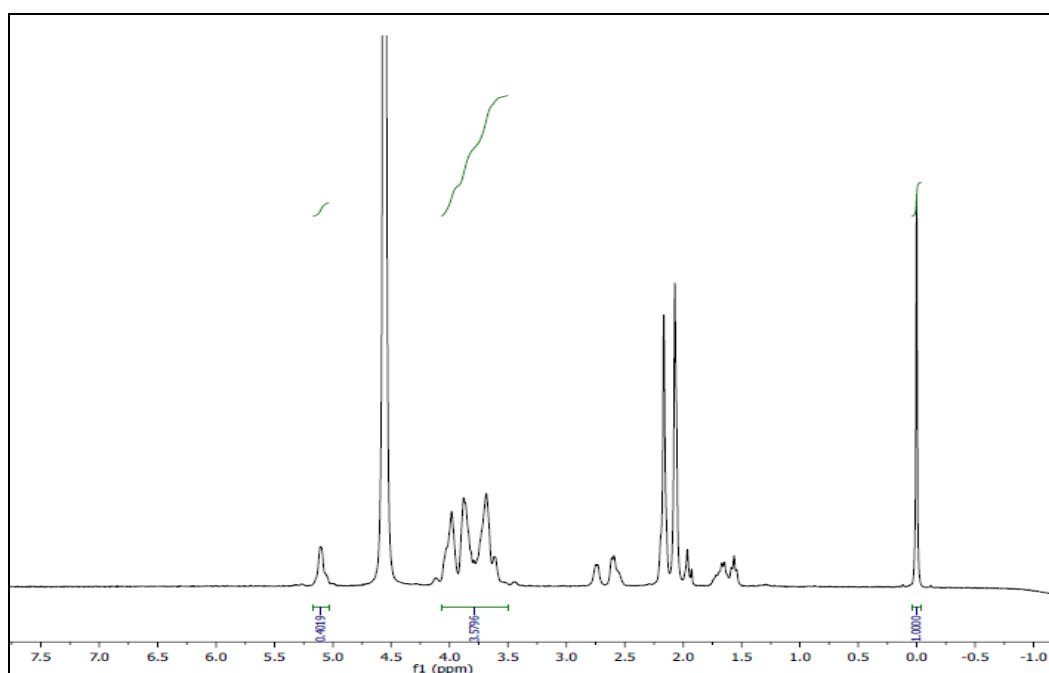
WHO – World Health Organization. **Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine.** WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series, N°594, Annex 2: Geneva, 1976.

WHO – World Health Organization. **Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine.** WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series, N°626, Annex 2: Geneva, 1978.

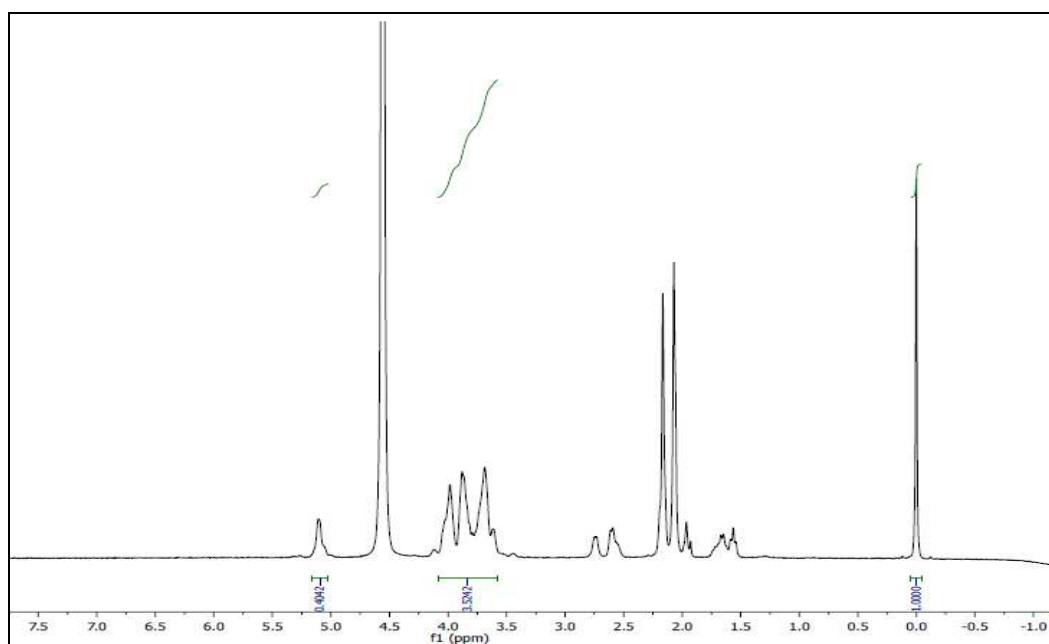
WHO – World Health Organization. **Requeriments for meningococcal polysaccharide vaccine.** Technica Report Series. N°. 658, Annex 6: Geneva, 1981.

WHO – World Health Organization. **Recommendations for the production and control of meningococcal group C conjugate vaccines.** Technical Report, Series N°. 924, Geneva, 2004.

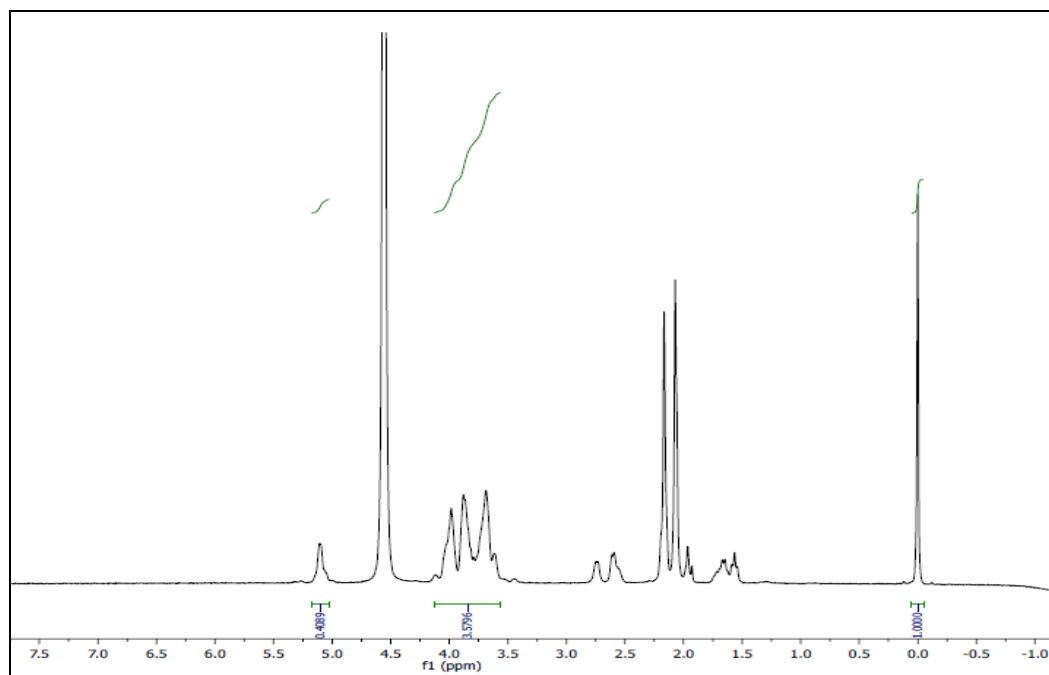
ANEXOS



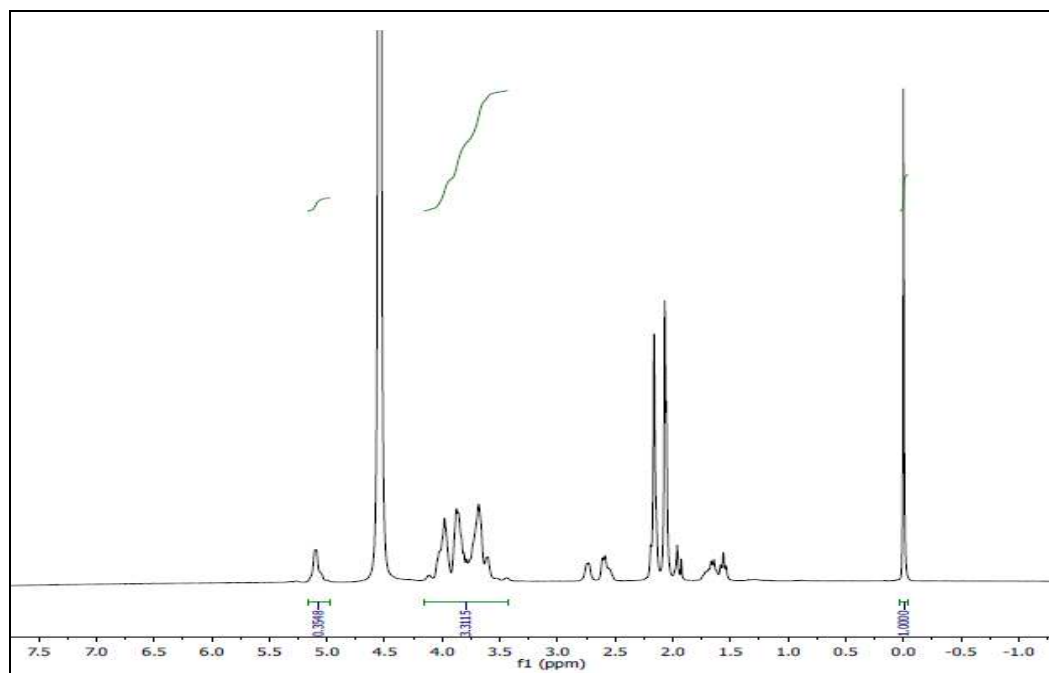
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0011



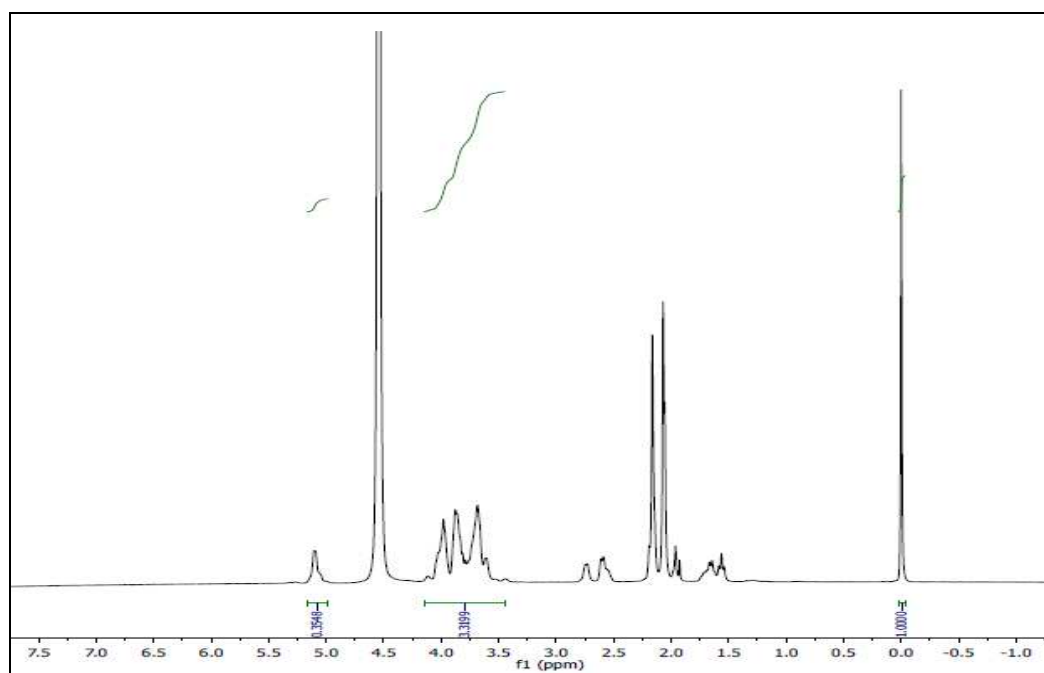
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0011



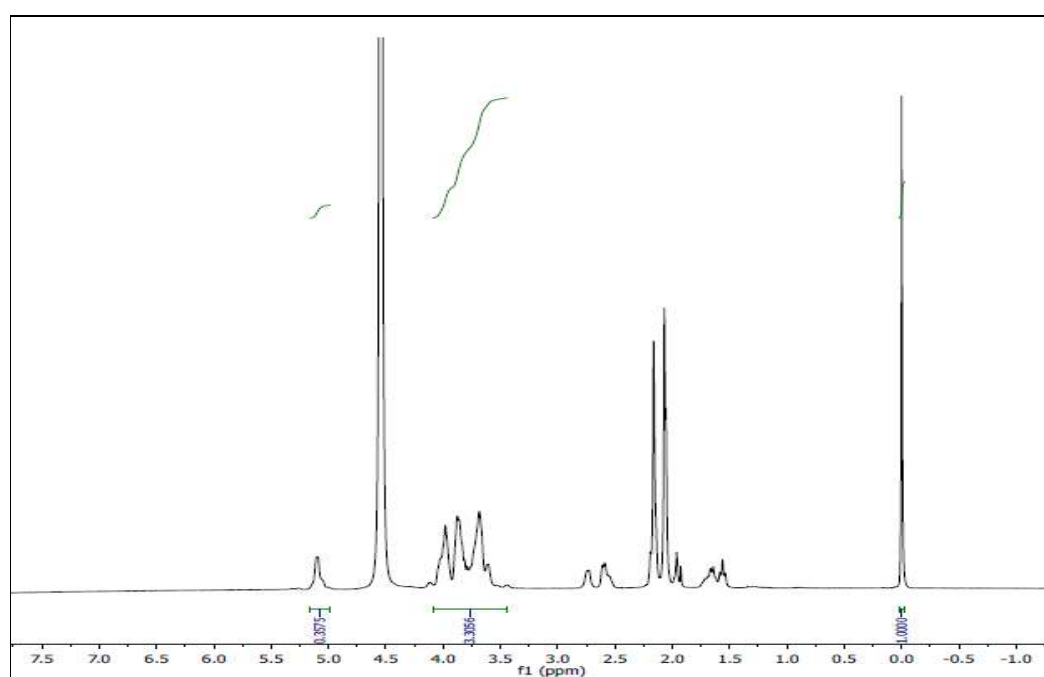
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMC0011



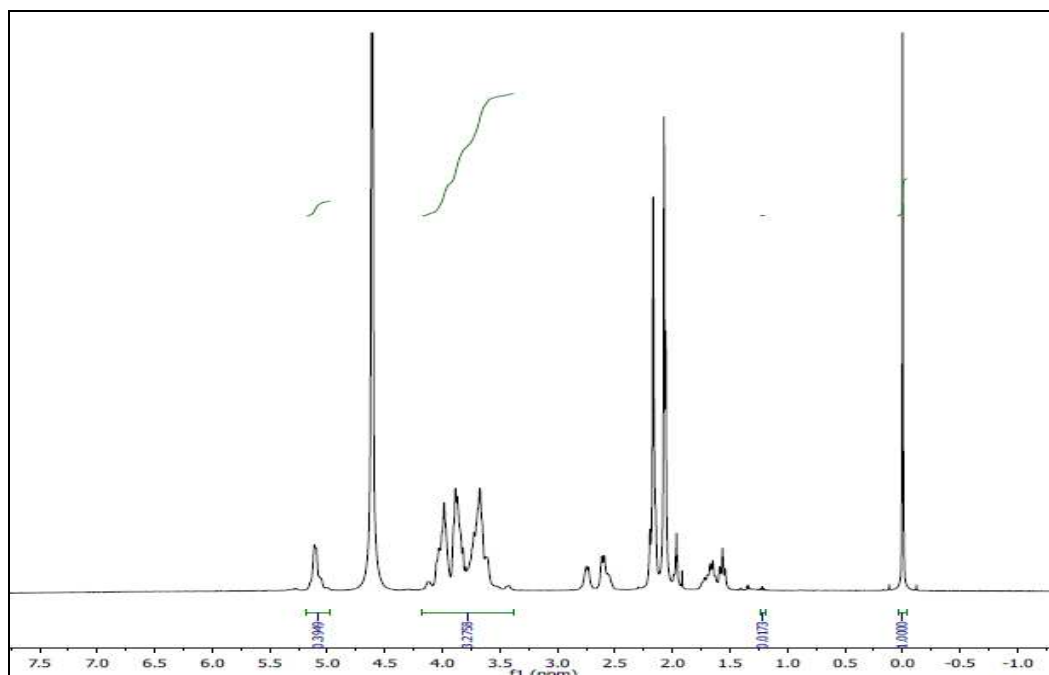
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0011



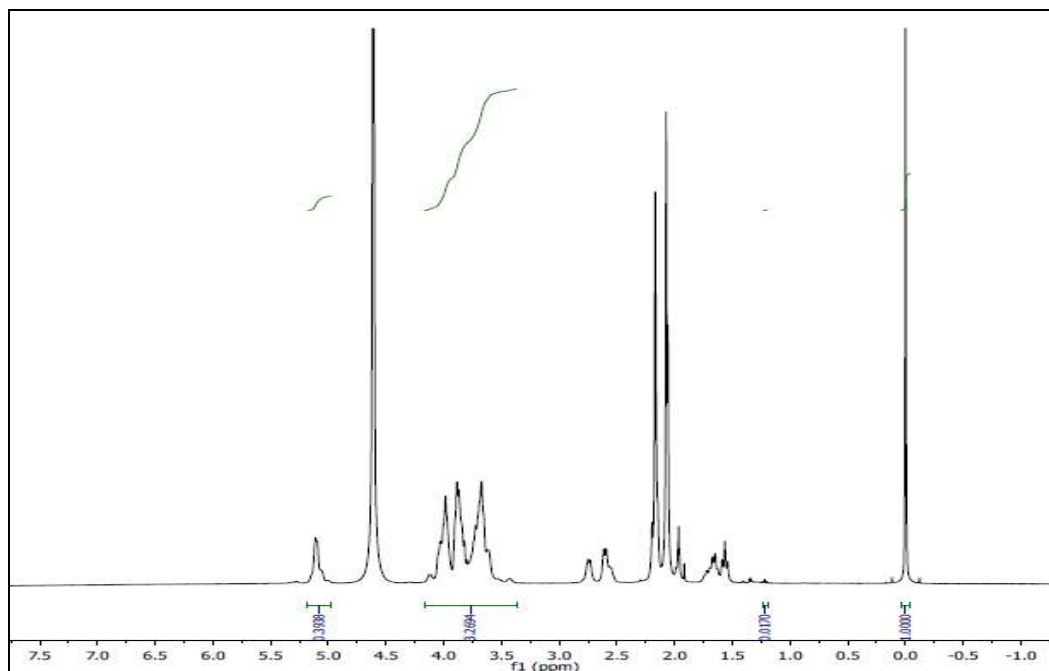
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0011



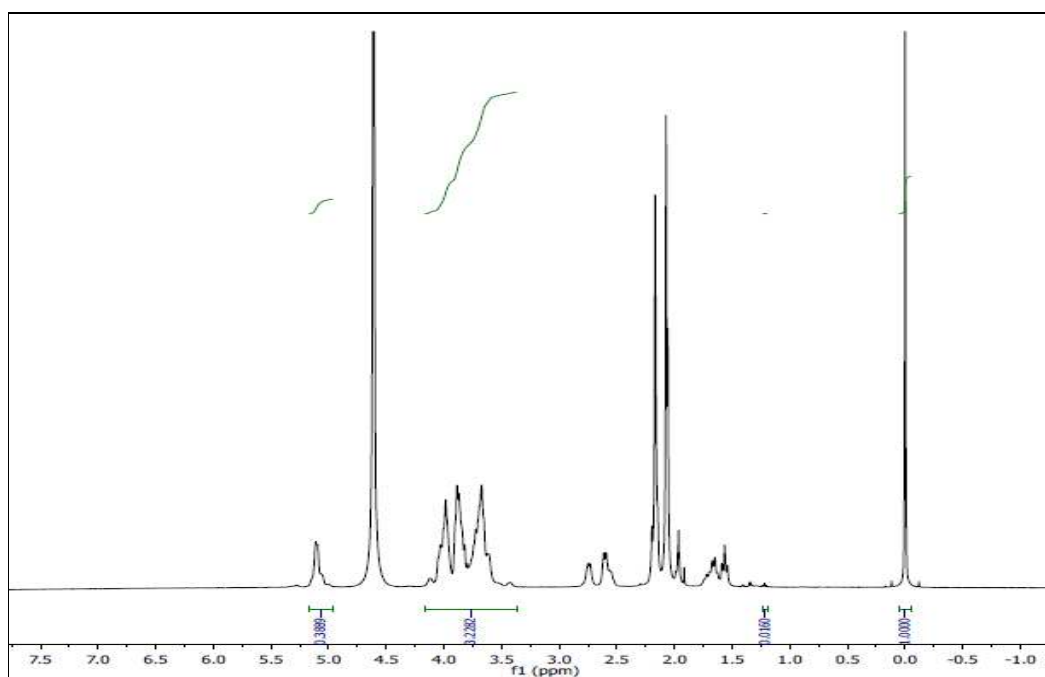
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0011



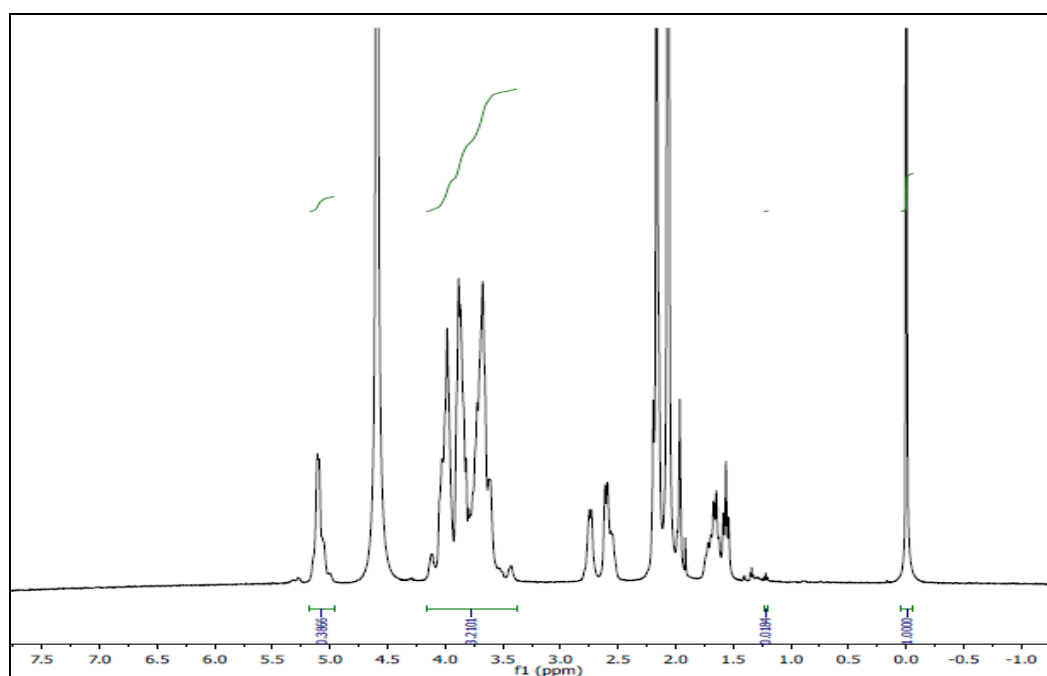
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0013



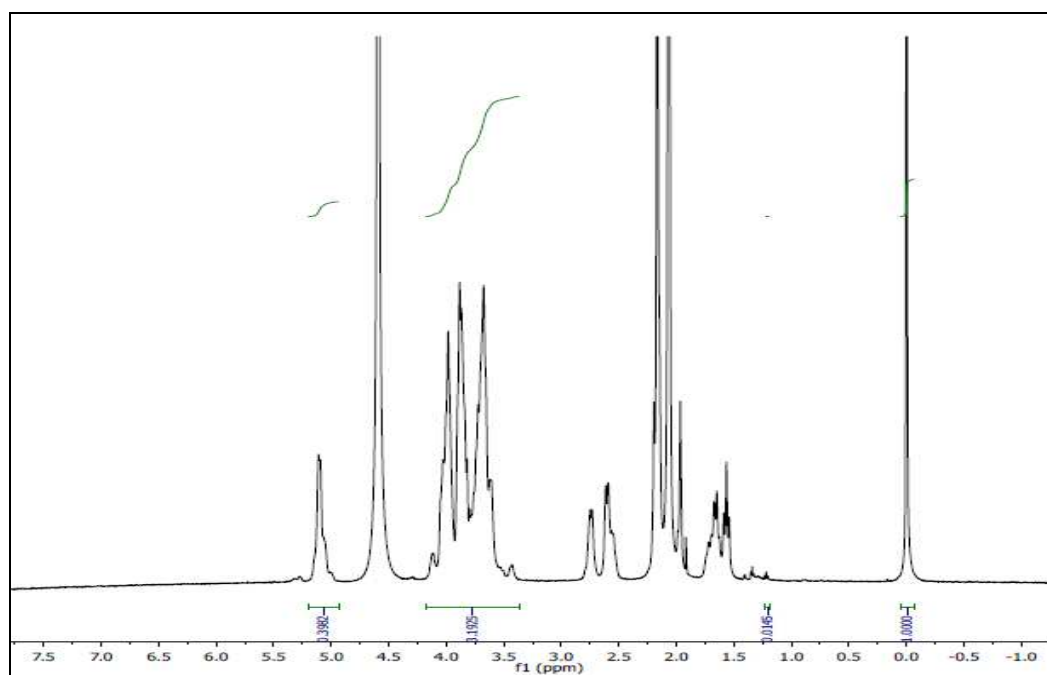
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0013



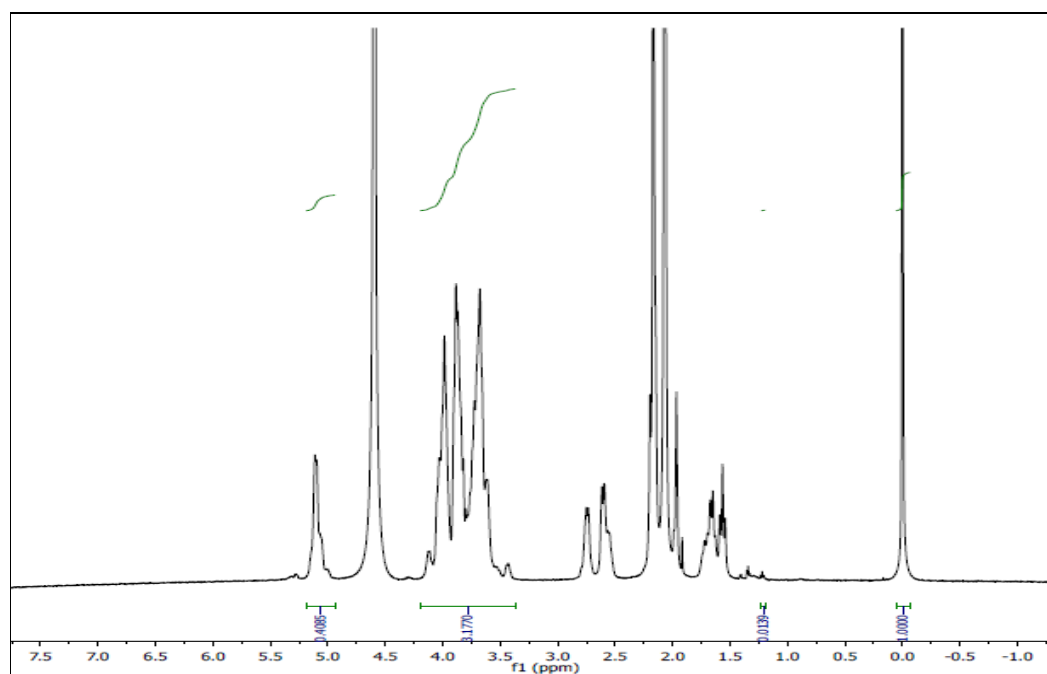
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMC0013



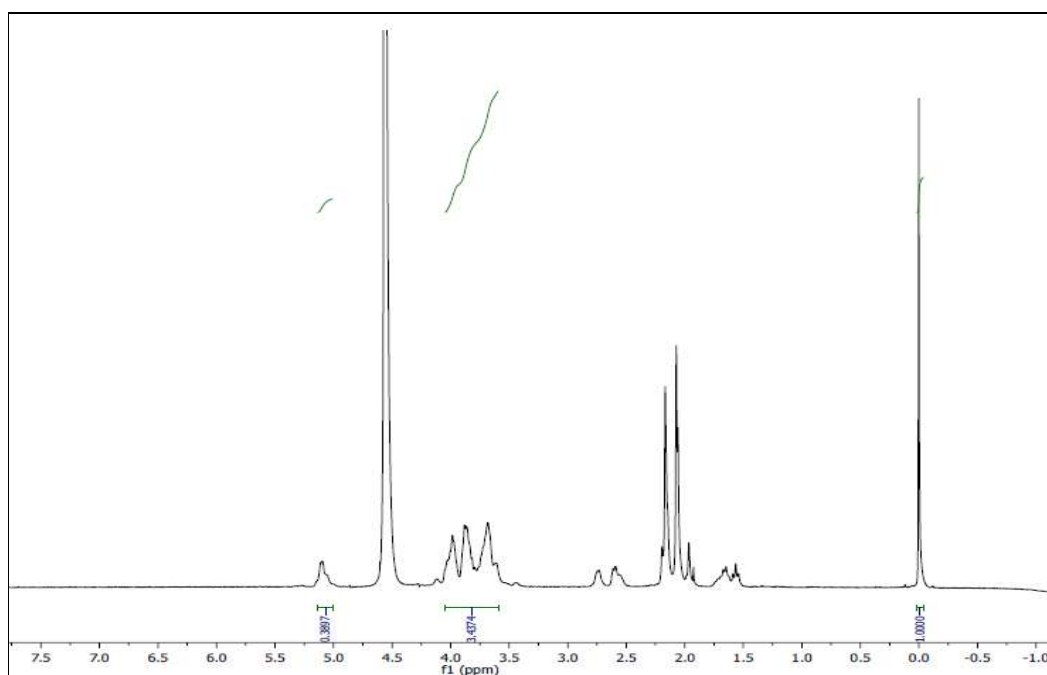
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0013



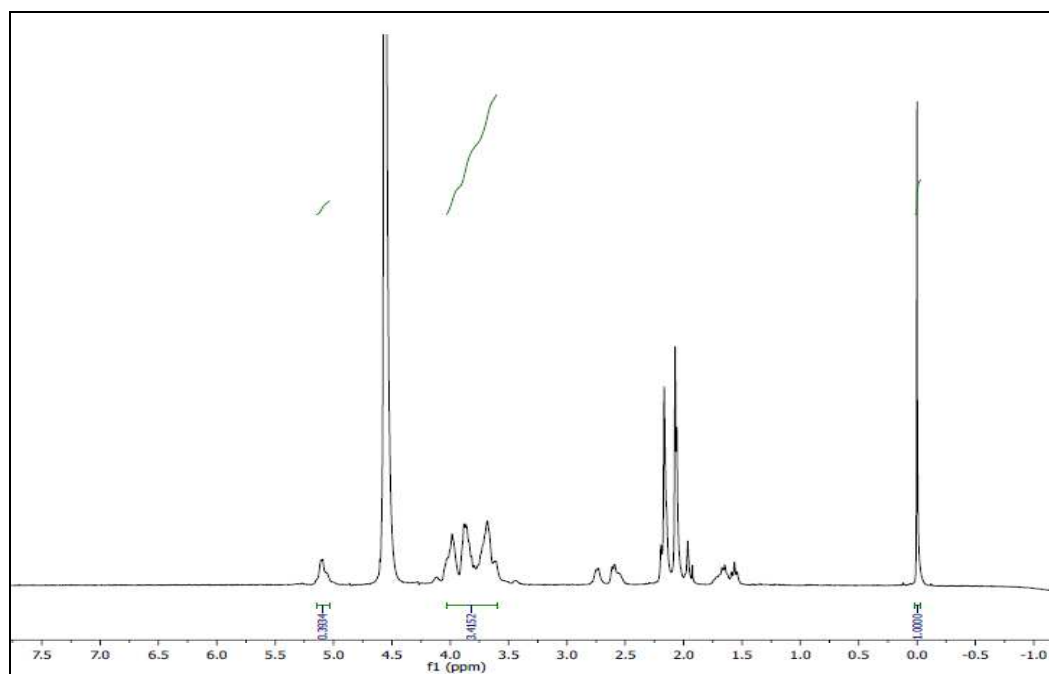
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0013



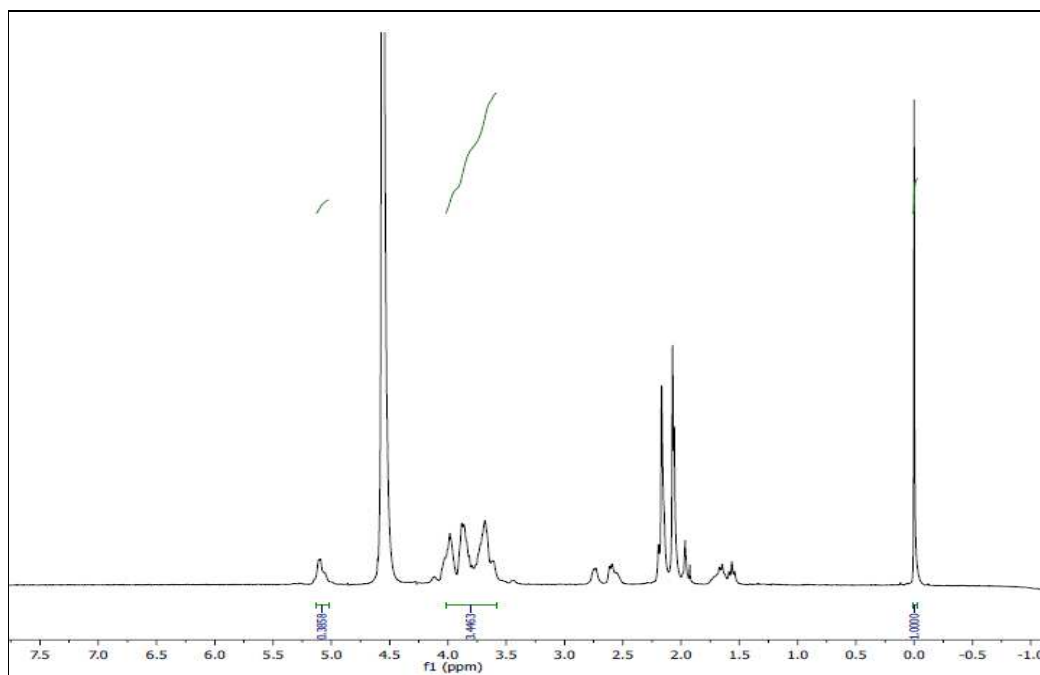
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0013



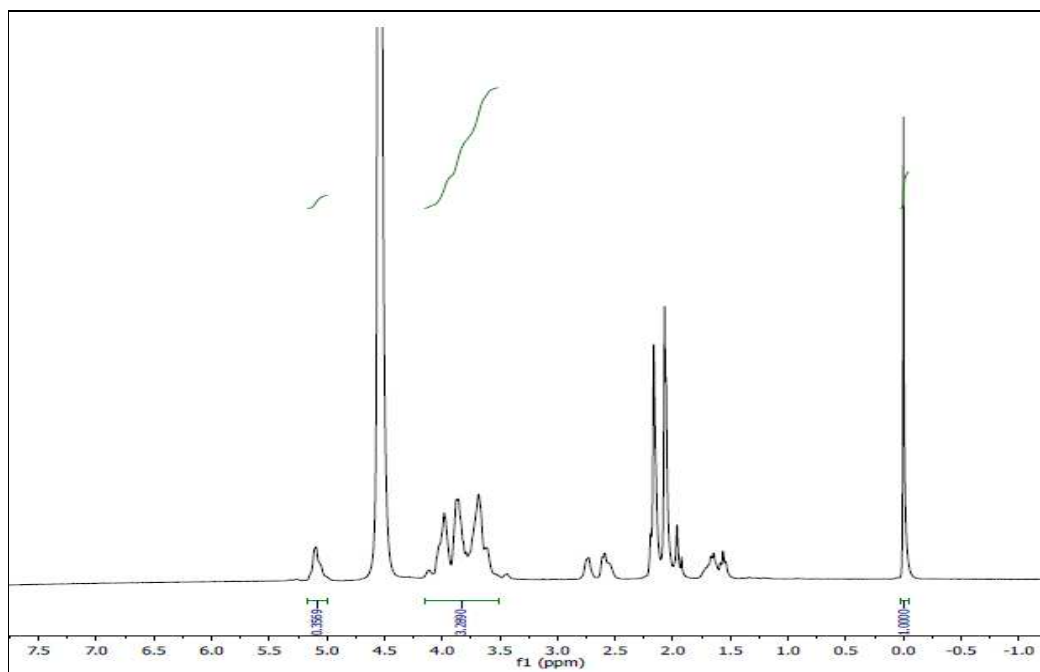
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0018



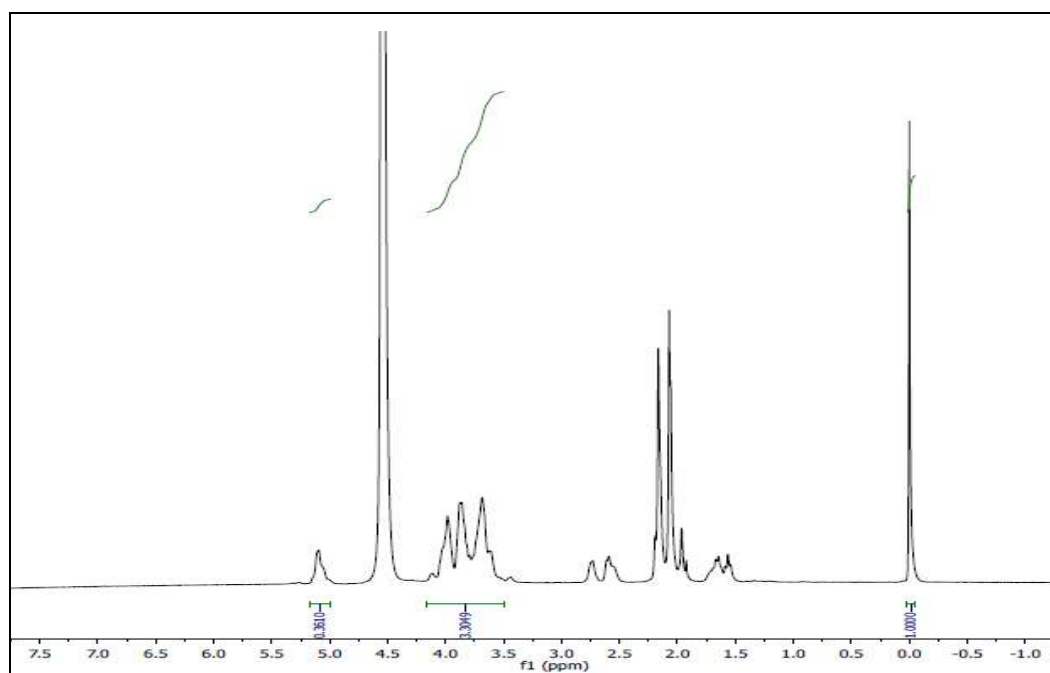
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC0018



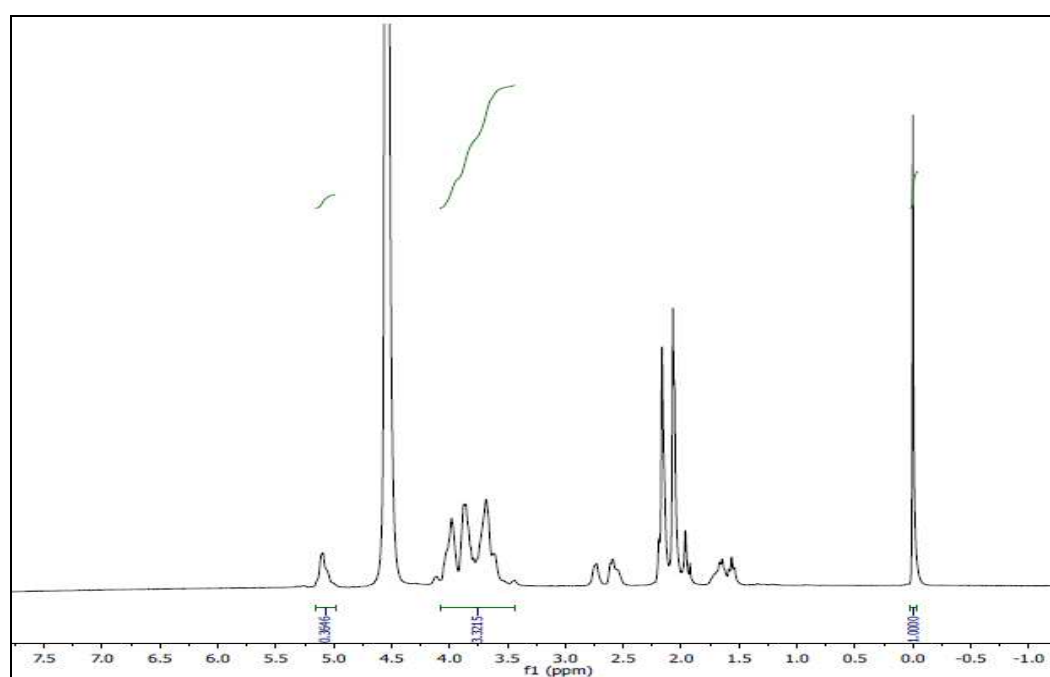
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMC0018



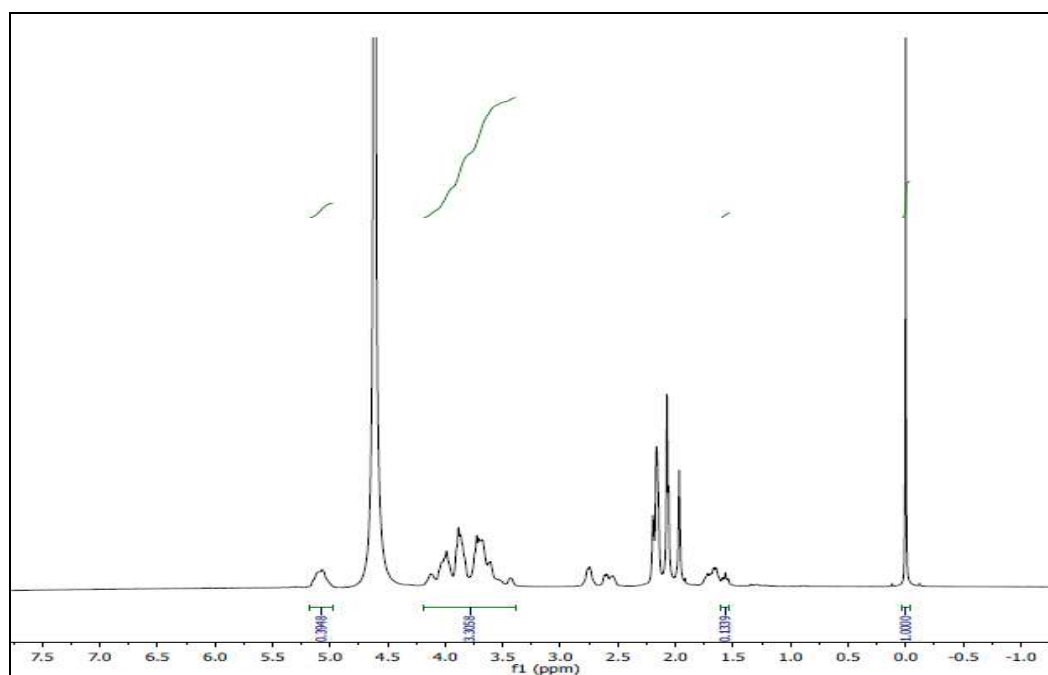
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0018



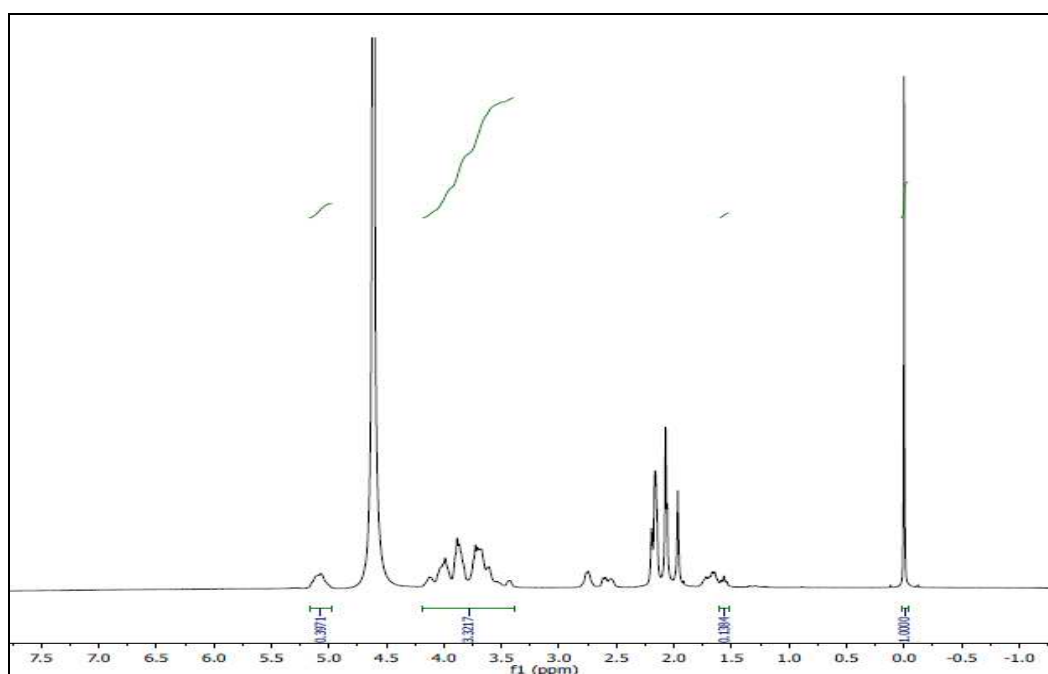
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0018



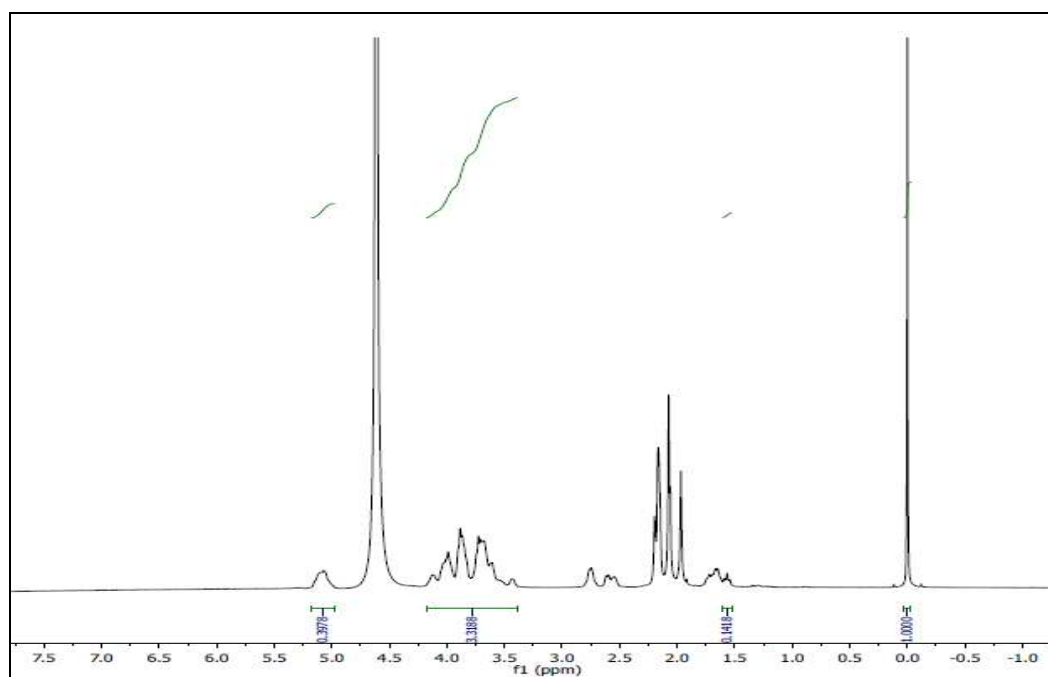
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC0018



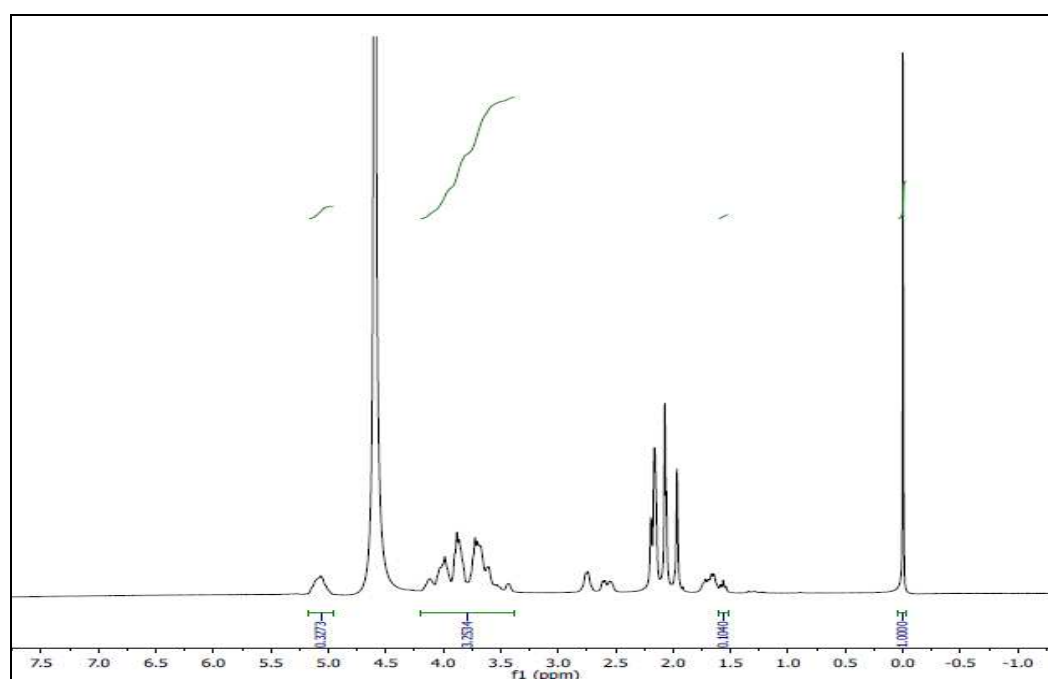
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC1001



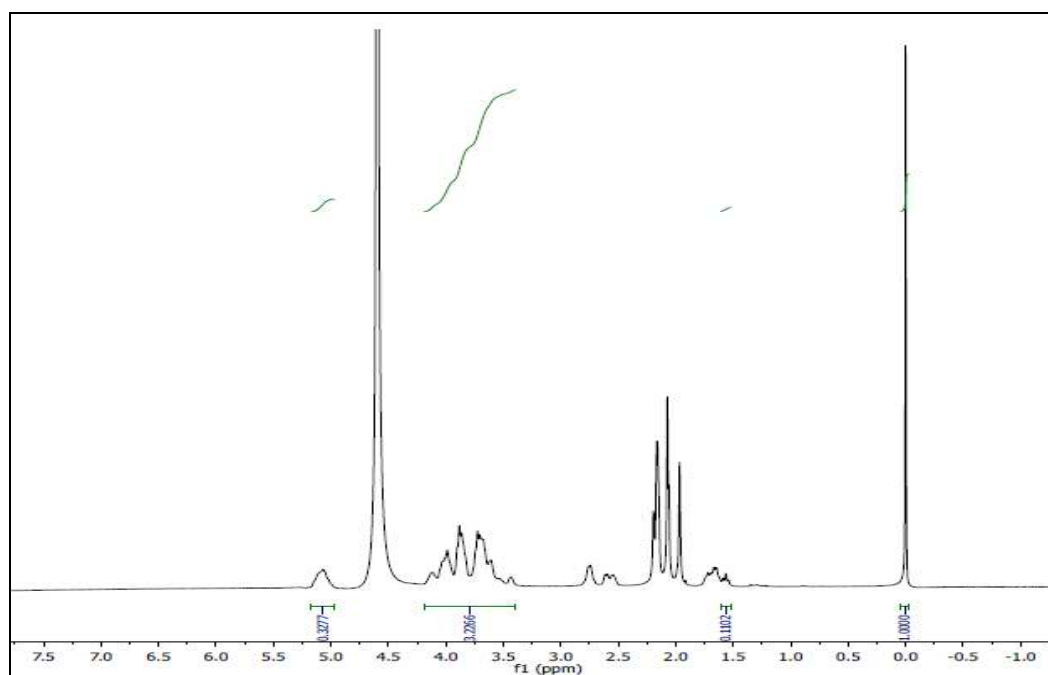
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMC1001



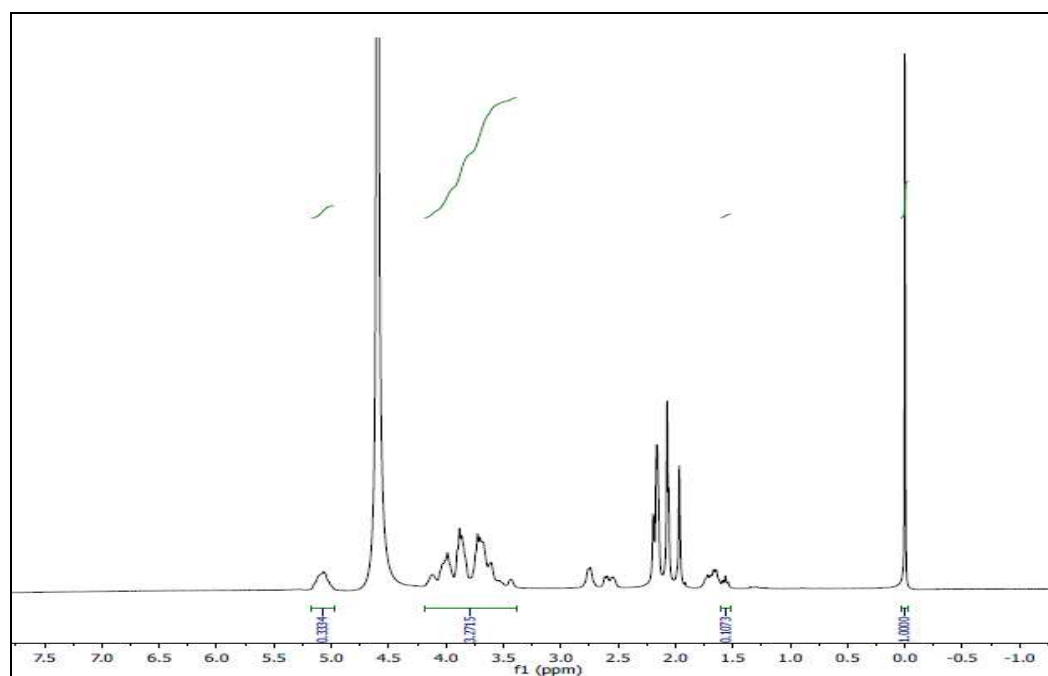
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMC1001



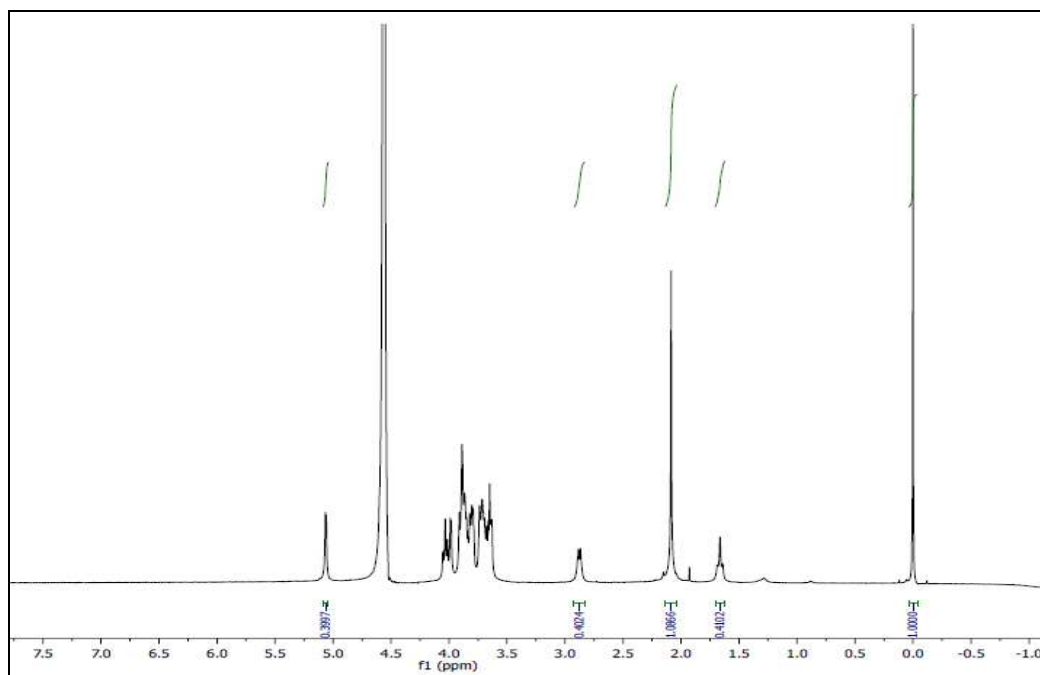
Espectro quantitativo do PSC em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC1001



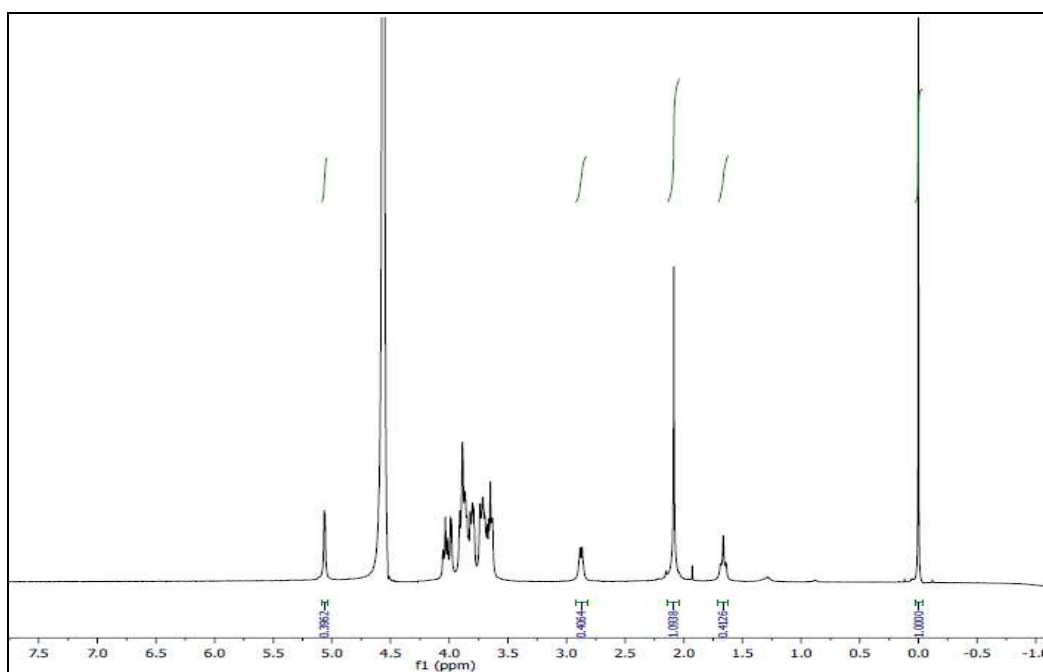
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC1001



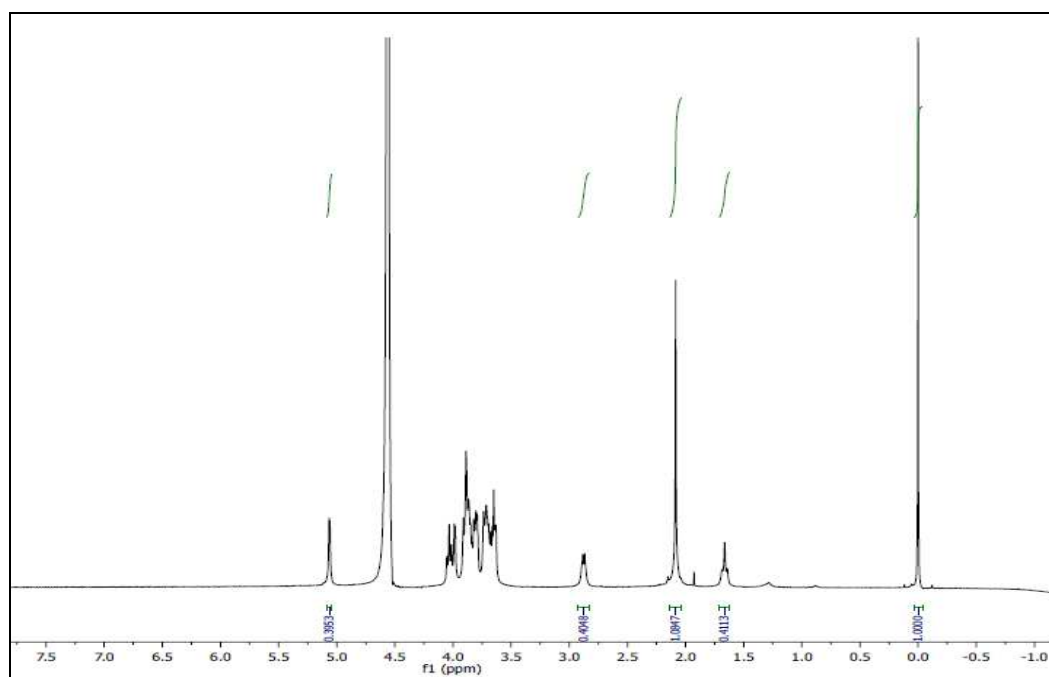
Espectro quantitativo do PSC em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMC1001



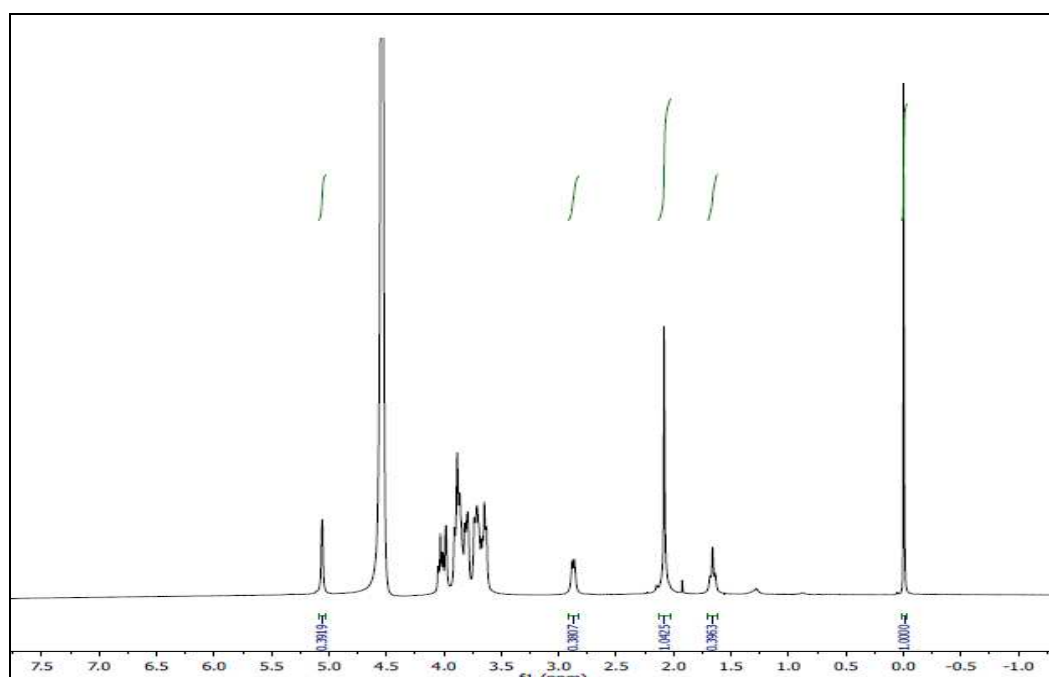
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando seqüência padrão de hidrogênio.
Lote:IMW0003



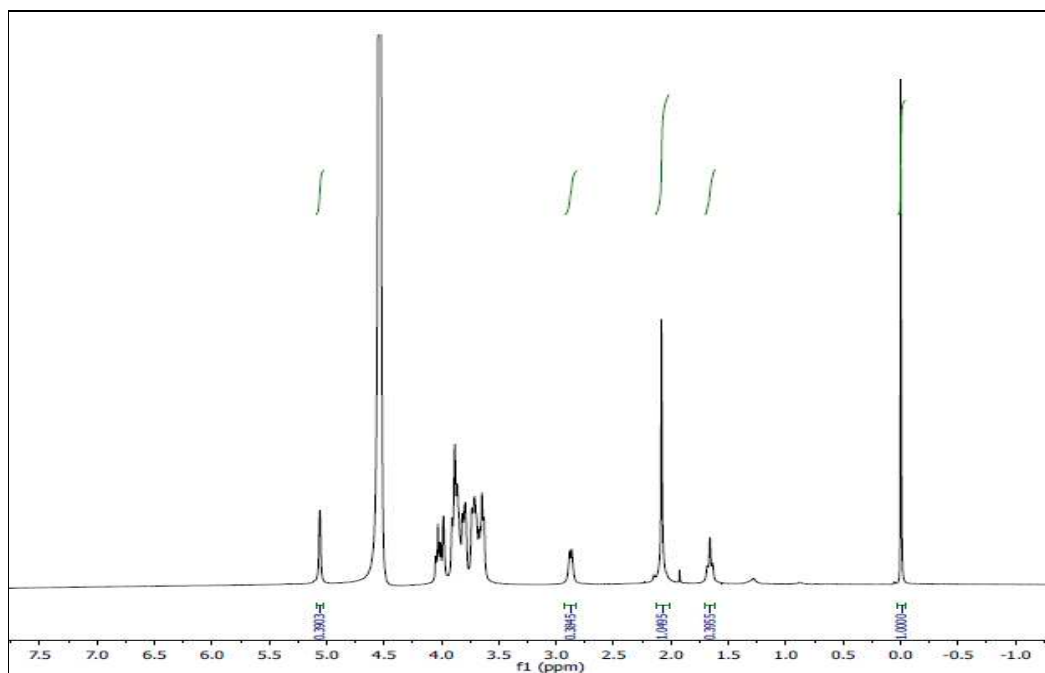
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando seqüência padrão de hidrogênio.
Lote:IMW0003



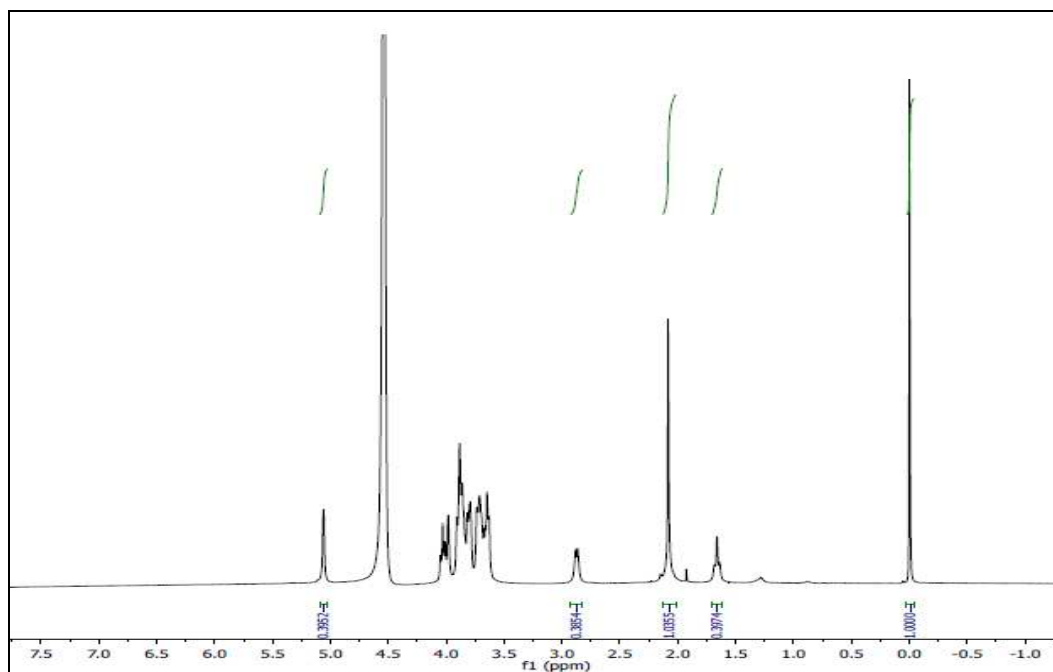
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMW0003



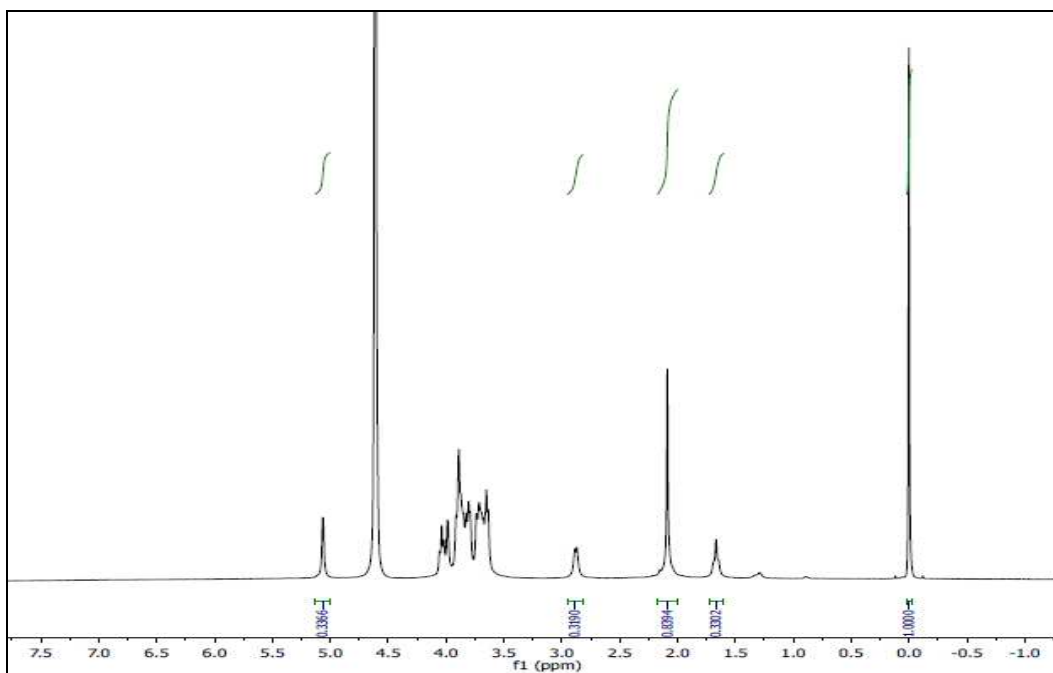
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0003



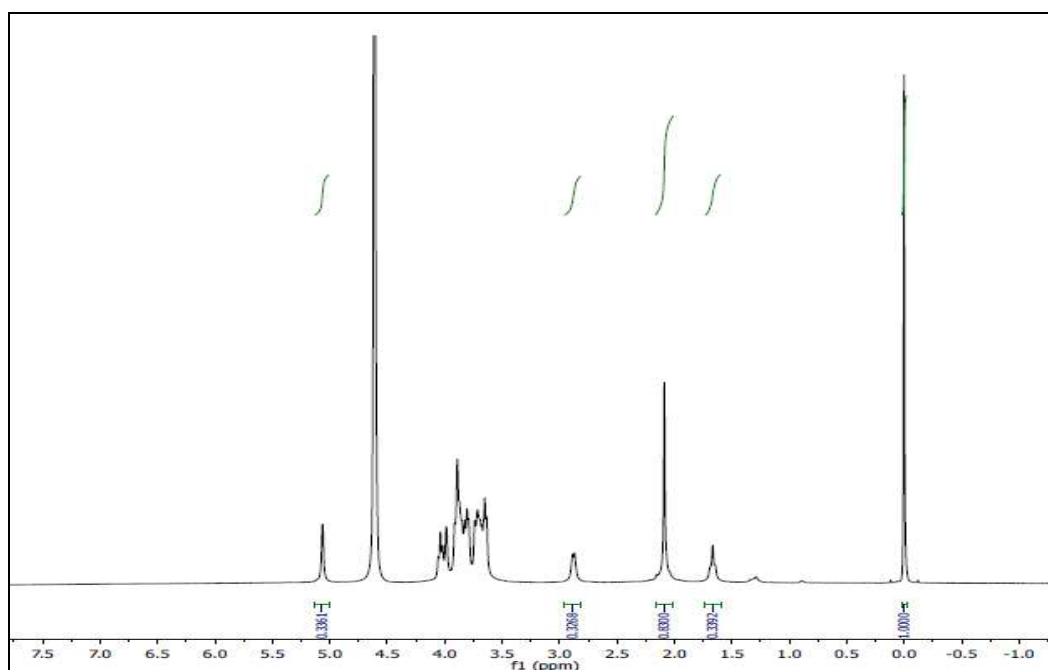
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0003



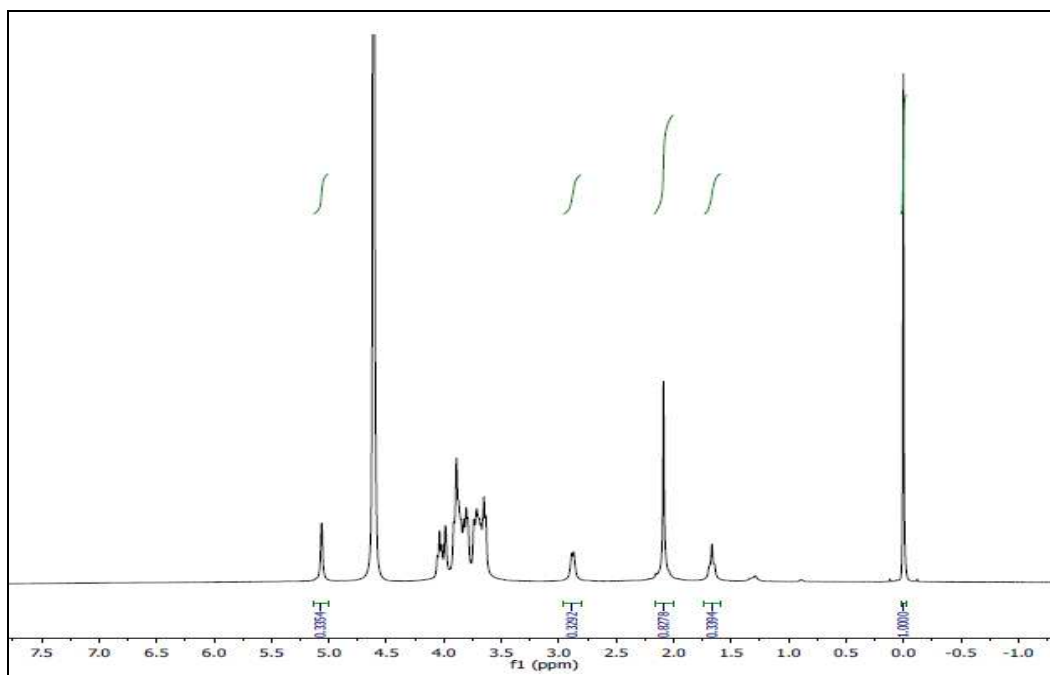
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0003



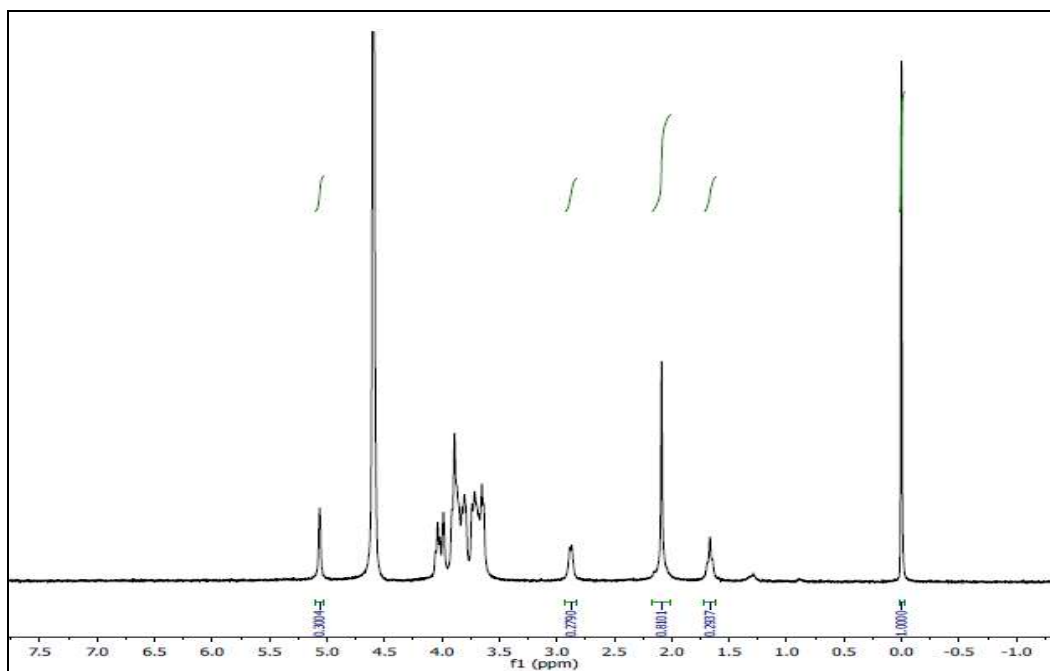
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMW0006



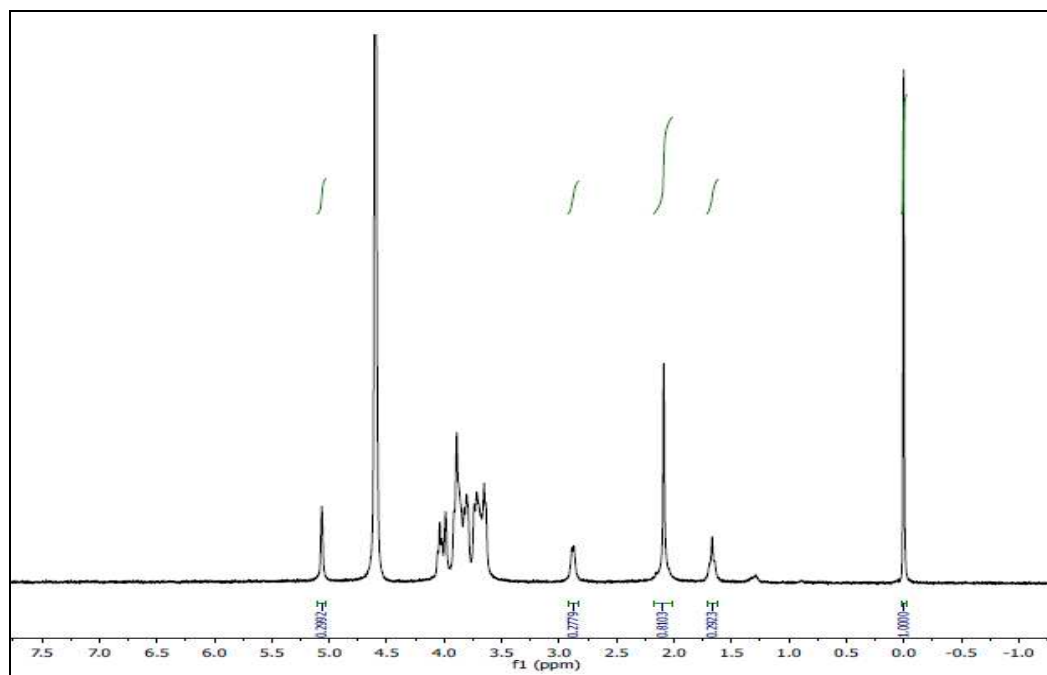
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:IMW0006



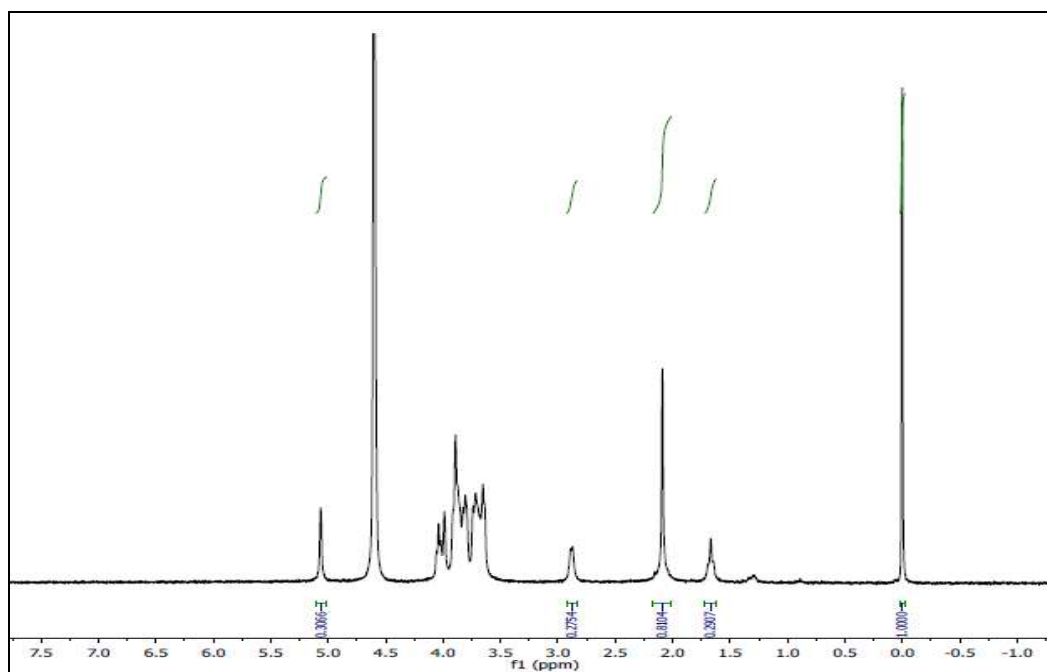
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:IMW0006



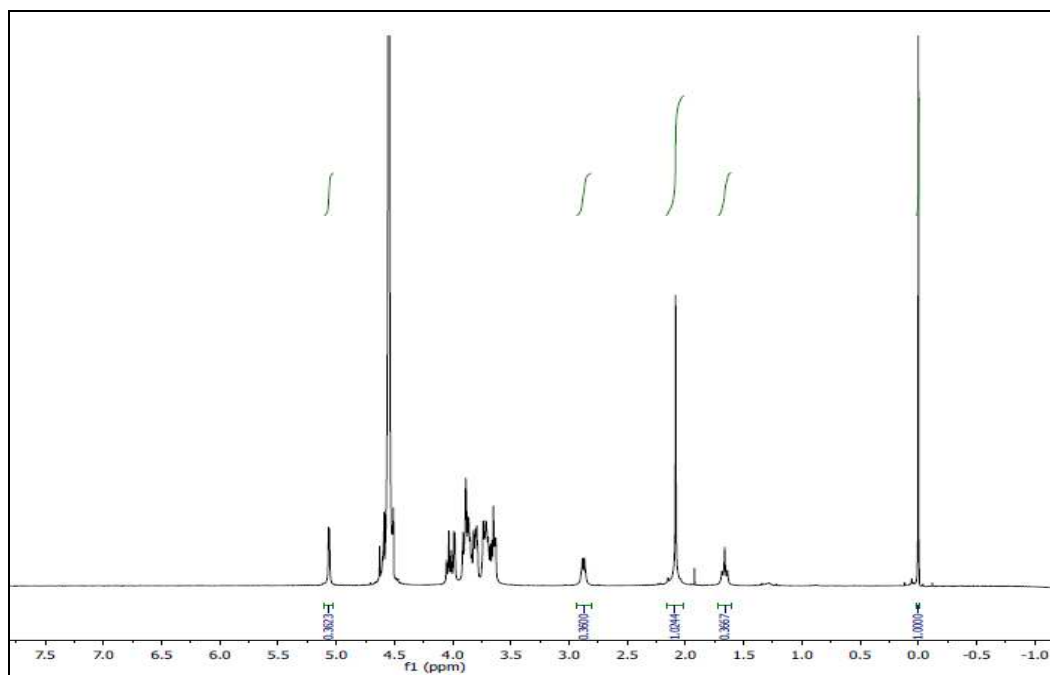
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0006



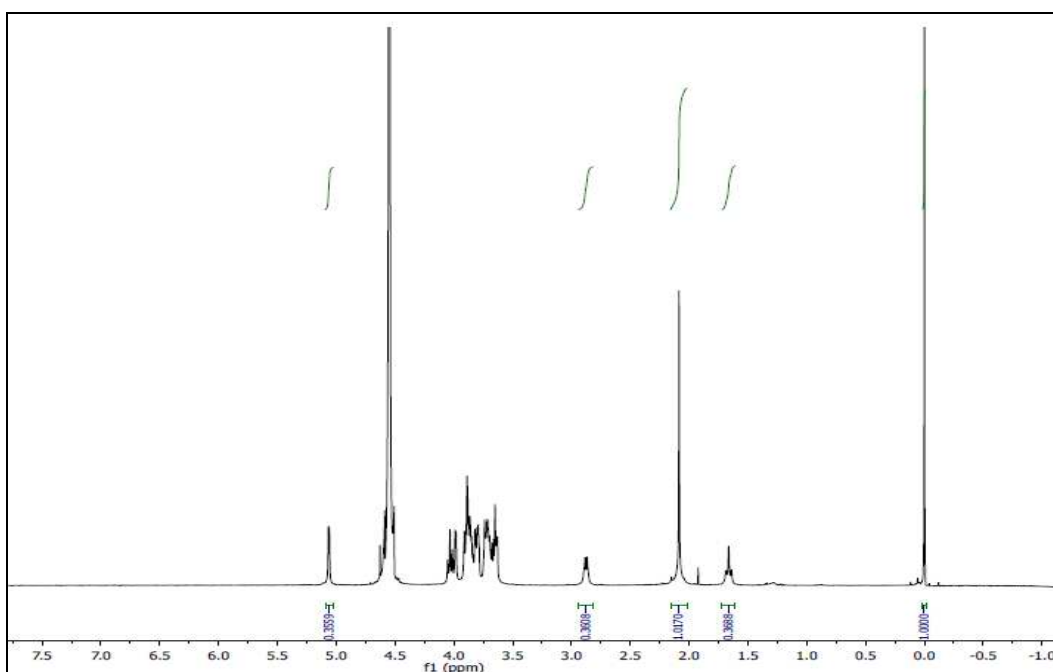
Espectro quantitativo do PSW135 em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0006



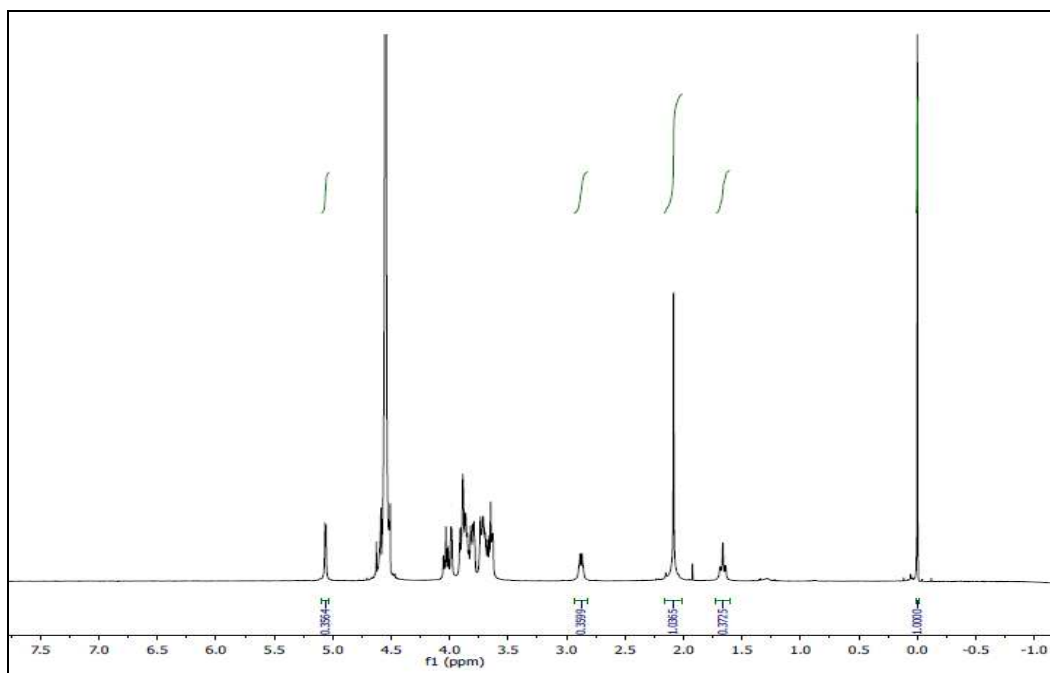
Espectro quantitativo do PSW135 em D_2O , 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:IMW0006



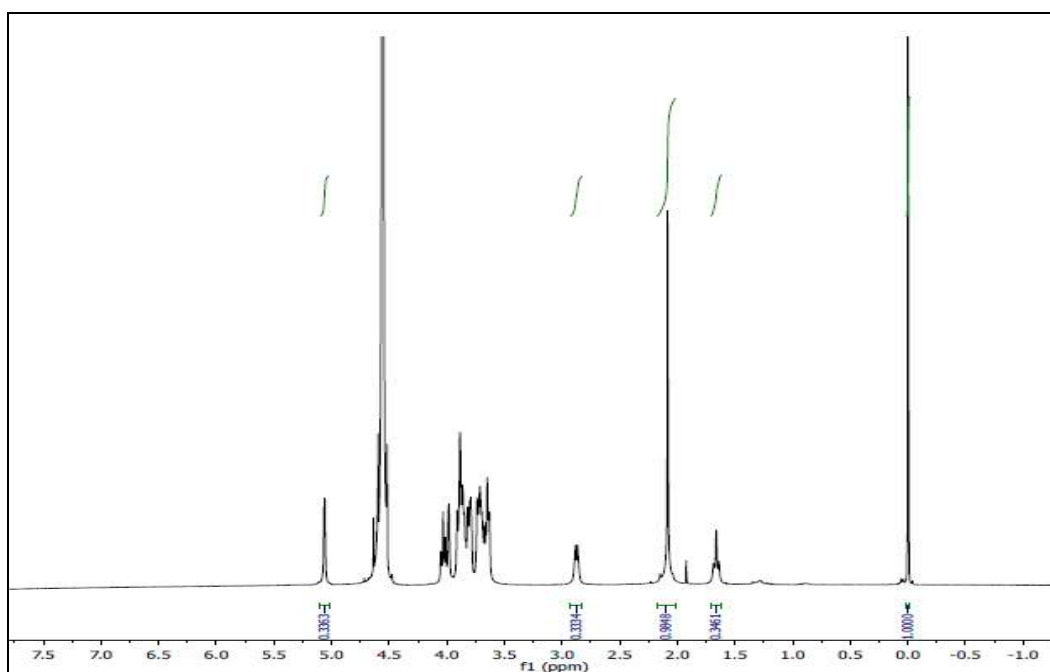
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:DF-007W



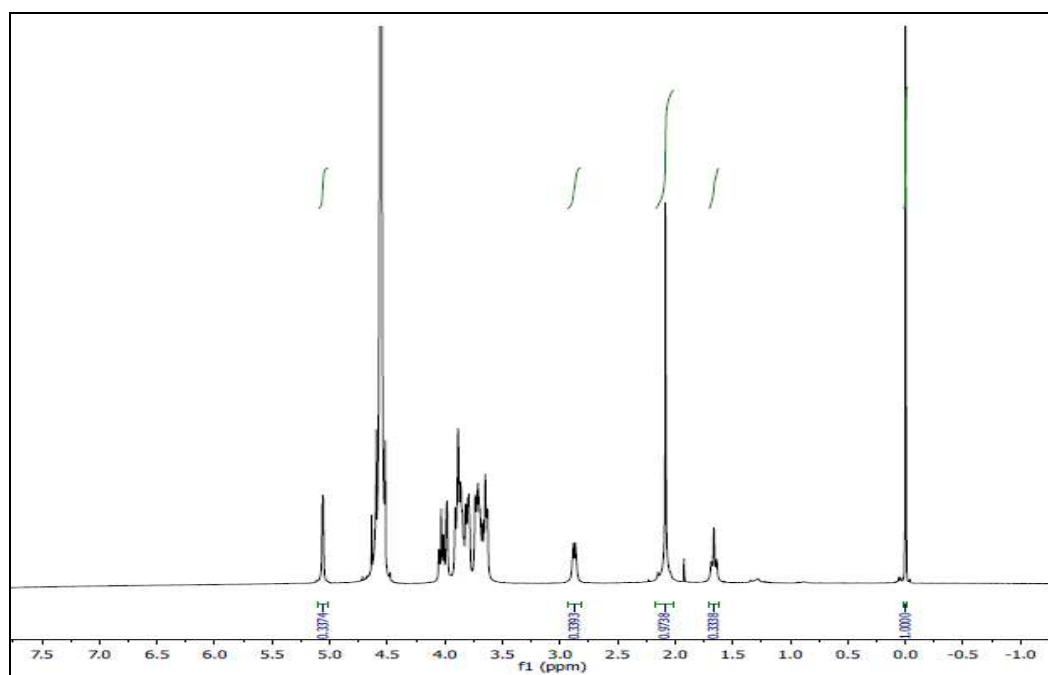
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:DF-007W



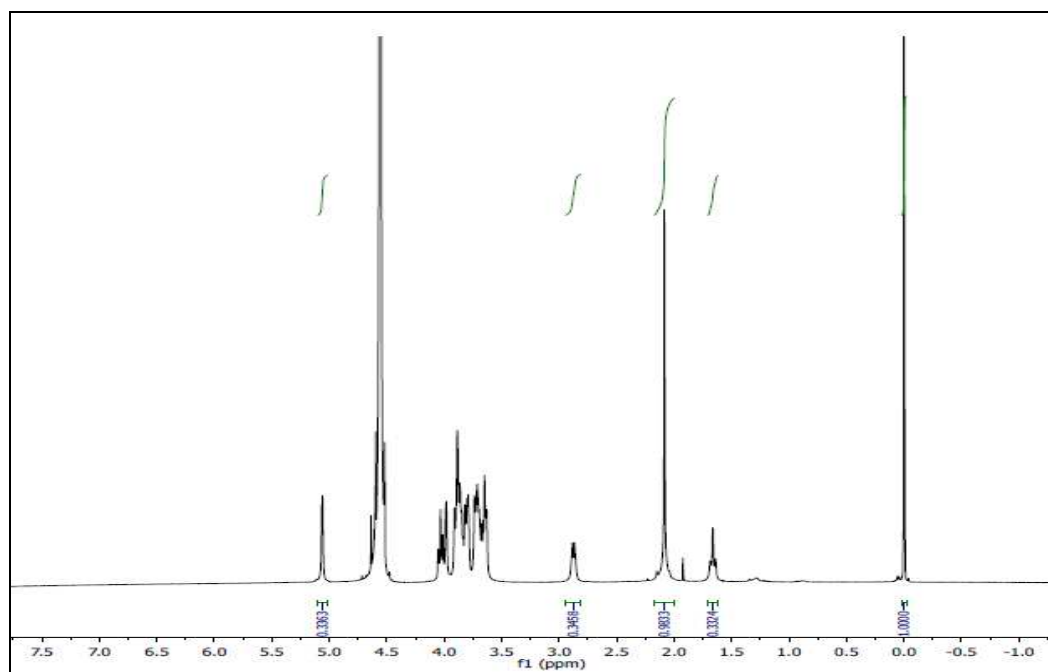
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:DF-007W



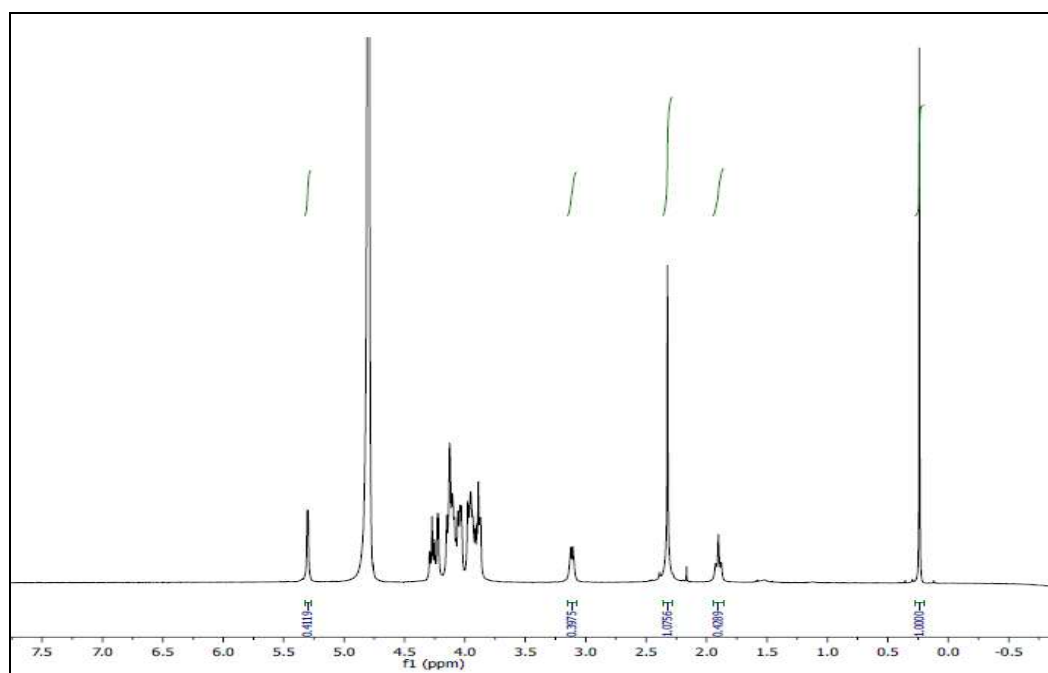
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-007W



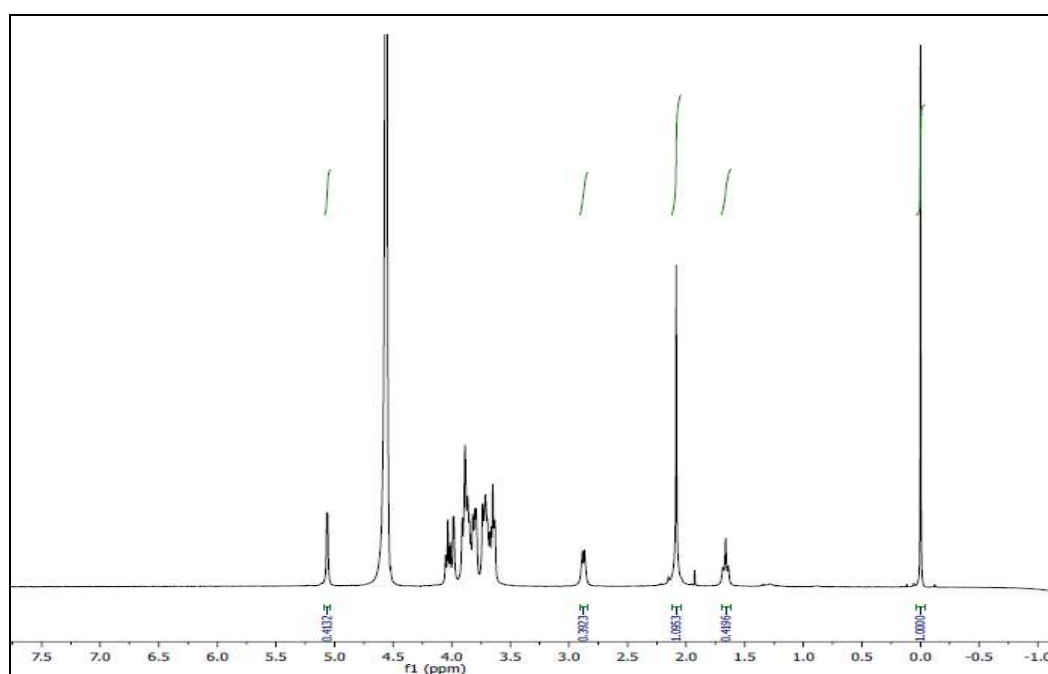
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-007W



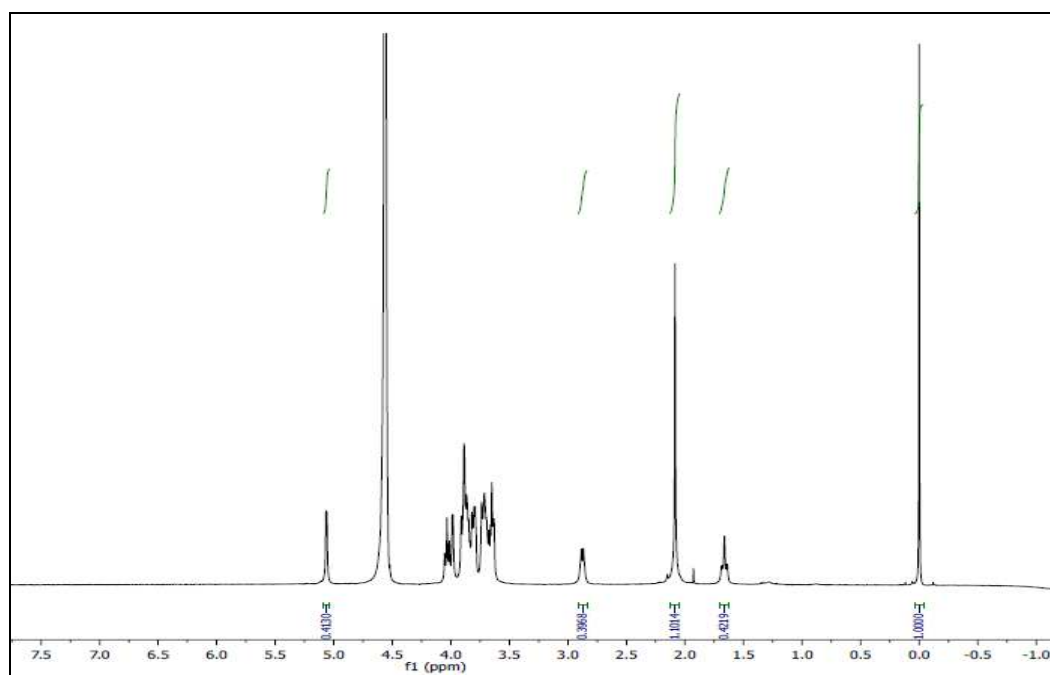
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-007W



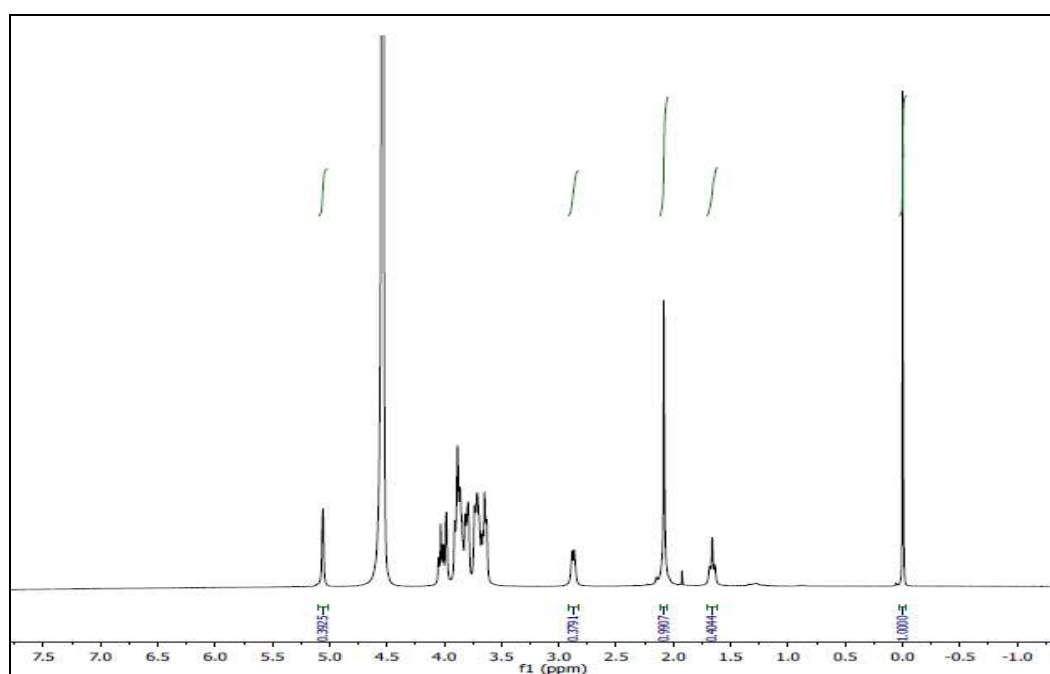
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:DF-008W



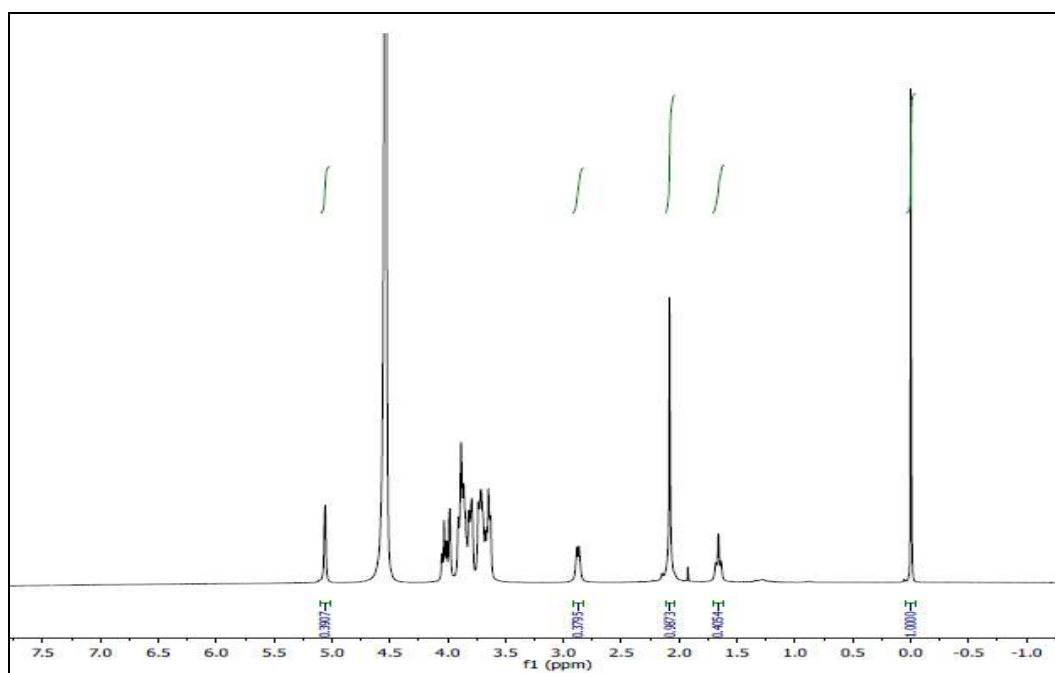
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio.
Lote:DF-008W



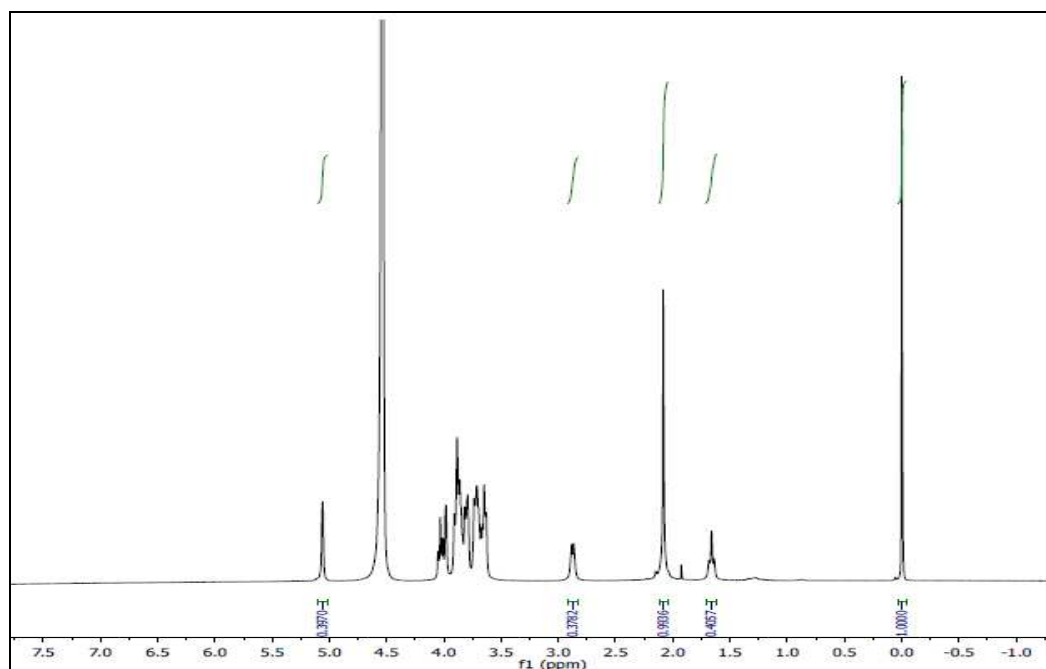
Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência padrão de hidrogênio. Lote:DF-008W



Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-008W



Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-008W



Espectro quantitativo do PSW135 em D₂O, 500MHz, utilizando sequência GARP. Lote:DF-008W