

PROGRAMA DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

Julio Cesar Queiroz Penha

**IDENTIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE PARA
USO HUMANO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Rio de Janeiro

2015

**IDENTIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE PARA
USO HUMANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a finalização do curso de residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Preceptor: Cláudia Maria da Conceição

Tutor: Filipe Soares Quirino

Rio de Janeiro

2015

Penha, Julio Cesar Queiroz

Identificação de hormônio de crescimento recombinante para uso humano por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

61f. : il., tab.

Trabalho de conclusão do curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptor: Claudia Maria da Conceição

Tutor: Filipe Soares Quirino da Silva

1. Espectrometria de massas. 2. Somatropina. 3. Vigilância Sanitária.

**IDENTIFICAÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE PARA
USO HUMANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a finalização do curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

DSc. Cláudia Maria da Conceição

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

MSc. Mychelle Alves Monteiro

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

MSc. Anna Carolina Machado Marinho

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus por poder estar aqui, por conhecer todos que conheci e por tudo que consegui.

Aos meus pais por todo o apoio, paciência e dedicação.

Aos meus amigos, que sempre estiveram presentes nos momentos que mais precisei.

Ao meu tutor, Filipe Quirino, por todo o apoio.

À minha PRECEPTORA, ORIENTADORA e MÃE, Claudia Maria, por toda a ajuda, paciência, apoio, dedicação, conselhos, ensinamentos, por tudo!

À melhor equipe: Adherlene, Anna Carolina, Ozéias, Luiza, Camilla, Andreza e Clarissa, por permitirem que esses dois anos ficassem marcados na minha vida! Sentirei muita saudade disso tudo!

A todos os amigos residentes!

À Silvana, coordenadora do curso de residência, por toda a paciência e apoio dispensados durante todo o curso.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela oportunidade de estar desenvolvendo o trabalho.

**Mesmo que a palavra
'obrigado' signifique tanto,
não expressará por inteiro o
quanto todos foram
importantes para mim.**

A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.

Leonardo Scorza de Souza

RESUMO

O hormônio do crescimento é produzido por células especializadas, os somatotrofos, localizadas na porção anterior da hipófise, também denominada de adeno-hipófise, sendo constituído por uma cadeia polipeptídica contendo 191 aminoácidos, duas pontes dissulfeto e com massa molecular de 22,125 Daltons (Da). A deficiência do hormônio de crescimento leva a manifestações clínicas e metabólicas diversas. O hormônio de crescimento recombinante humano (HCrh) passou a ser obtido pela tecnologia do DNA recombinante na década de 80, aumentando a qualidade e disponibilidade dos produtos obtidos, o que exigiu um controle mais eficaz dos produtos disponíveis à população. A carência de uma metodologia para identificação do composto no compêndio nacional fortalece a necessidade do desenvolvimento de técnicas para a identificação do hormônio de crescimento. Para a realização do experimento foram utilizadas quatro amostras oriundas de um mesmo fabricante e um padrão da Farmacopeia Europeia. Para a realização do experimento de proteína intacta, o padrão e as amostras não sofreram nenhum tratamento prévio. Todos foram diluídos utilizando uma solução de ácido fórmico 0,1%, obtendo uma concentração de $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ para ambos. Para as replicatas do padrão foram encontrados picos majoritários de massa 22126,41 Da e 22126,51 Da, para as replicatas da amostra 1 foram encontrados valores de 22125,92 Da e 22125,82 Da, para as replicatas da amostra 2 foram encontrados os valores de 22125,79 Da e 22125,75 Da, para as replicatas da amostra 3 foram encontrados os valores de 22125,74 Da e 22125,89 Da, e para as replicatas da amostra 4 foram encontrados os valores de 22125,87 Da e 22125,88 Da. Os resultados permitiram a identificação da somatropina nas amostras analisadas em conformidade com o padrão utilizado, de acordo com a massa preconizada pela FE de 22,125 Da. Com o experimento também foi possível definir o erro máximo de massa exata, em ppm, de 65,0 para o padrão e de 38,5 nas amostras, demonstrando a exatidão na determinação inequívoca da massa do hormônio de acordo com a massa de 22125 Da preconizada na FE.

Palavras chave: Espectrometria de massas. Somatropina. Vigilância sanitária.

ABSTRACT

Growth hormone is produced by specialized cells, the somatotrophs, located in the anterior pituitary, consisting of a polypeptide chain containing 191 amino acids, two disulfide bonds and molecular mass of 22,125 Daltons (Da). The deficiency of growth hormone leads to various clinical and metabolic manifestations. Recombinant human growth hormone (rhGH) has to be obtained by recombinant DNA technology since the 80's, increasing the quality and availability of the products obtained, which required a more effective control of the products available to the population. The lack of a methodology to identify the compound in the national compendium reinforces the need to develop techniques for the identification of growth hormone. To perform the experiment there were four samples from the same manufacturer and a standard of the European Pharmacopoeia. To perform the intact protein experiment, the standard and the samples suffered no previous treatment. All were diluted using a solution of formic acid 0.1%, achieving a concentration of $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for both. For standard replicates were found mass majority peaks 22126.41 Da and 22126.51 Da, for replicates of sample 1 were found the values of 22125.92 Da and 22125.82 Da; for the replicates of sample 2 were found the values of 22125.79 Da and 22125.75 Da; for the replicates of sample 3 were found the values of 22125.74 Da and 22125.89 Da; and for the replicates of sample 4 were found the values of 22125.87 Da and 22125.88 Da. The results allowed the identification of somatotropin in the samples analyzed in accordance with the standard used, according to the mass advocated by FE 22125 Da. With the experiment was also possible to define the maximum error of exact mass in ppm, 65.0 to 38.5 in the standard and samples demonstrating the accuracy in unequivocal determination of the mass of the hormone according to the mass of 22,125 Da recommended in EP.

Key words: Mass spectrometry. Somatotropin. Health surveillance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cadeia linear de aminoácidos da somatropina. Setas: pontes dissulfeto.....p 17
- Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínasp 27
- Figura 3: Cromatografia líquida de exclusão molecularp 28
- Figura 4: Ordem de eluição dos analitos de acordo com o seu tamanho na cromatografia líquida de exclusão molecularp 29
- Figura 5: Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas.....p 30
- Figura 6: Espectrômetro de massas modelo SYNAPT G2-S HDMS fabricado pela Waters Corporation.....p 31
- Figura 7: Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas modelo SYNAPT G2-S HDMS fabricado pela Waters® Corporation.....p 35
- Figura 8: Cromatograma obtido para primeira replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 40
- Figura 9: Cromatograma obtido para segunda replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 40
- Figura 10: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 1 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 41
- Figura 11: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 1 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 41
- Figura 12: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 2 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 42
- Figura 13: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 2 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 42
- Figura 14: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 3 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 43
- Figura 15: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 3 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$p 43

Figura 16: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 4 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 44
Figura 17: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 4 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 44
Figura 18: Espectro não deconvoluído obtido para primeira replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 45
Figura 19: Espectro não deconvoluído obtido para segunda replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 45
Figura 20: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 1 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 46
Figura 21: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 1 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 46
Figura 22: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 2 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 47
Figura 23: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 2 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 47
Figura 24: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 3 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 48
Figura 25: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 3 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 48
Figura 26: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 4 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 49
Figura 27: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 4 utilizada de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	p 49
Figura 28: (A) Espectros obtidos para as replicatas do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina	p 50
Figura 29: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 1 de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina	p 51
Figura 30: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 2 de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.....	p 52
Figura 31: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 3 de concentração $50\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina	p 53

Figura 32: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 4 de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina
.....p 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Informações sobre os diferentes sistemas utilizados na produção de proteínas recombinantes..... p 20
- Tabela 2: Fornecedores, nomes comerciais e formulações do hormônio de crescimento disponíveis para compras públicas..... p 23
- Tabela 3: Relação dos compêndios oficiais e metodologias utilizadas para a identificação do hormônio de crescimento recombinante para uso humano.....p 26
- Tabela 4: Condições operacionais do cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas para análise da proteína intacta.....p 36
- Tabela 5: Gradiente de concentração utilizado na cromatografia líquida de ultra eficiência.....p 37
- Tabela 6: Valores obtidos na avaliação das massas moleculares e o erro em ppm encontrado durante a análise da proteína intacta.....p 56
- Tabela 7: Massas obtidas no experimento para as replicatas do padrão farmacopeico e amostras.....p 57

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMED	Câmara de Medicamentos
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EP	European Pharmacopoeia
ESI	Electrospray
FE	Farmacopeia Europeia
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FT-ICR	Fourier-transform cyclotron resonance
GH	Growth hormone
GHIH	Growth hormone inhibiting hormone
GHRH	Growth hormone releasing hormone
HCrh	Hormônio de crescimento recombinante humano
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
PPM	Partes por milhão
rhGH	Recombinant human growth hormone
SUS	Sistema Único de Saúde
TOF	Time-of-flight
UI	Unidade internacional
UPLC	Ultra pressure liquid chromatography
USP	United States Pharmacopoeia
VISA	Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO	16
1.2 OS BIOFÁRMACOS	18
1.3 A BIOTECNOLOGIA E OS SISTEMAS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	20
1.4 O PROGRAMA DE MEDICAMENTOS DE DISPENSAÇÃO EM CARÁTER EXCEPCIONAL	22
1.5 O PAPEL DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE	24
1.6 A SOMATROPINA E OS COMPÊNDIOS OFICIAIS.....	26
1.7 METODOLOGIAS ANALÍTICAS COMUMENTE UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS	27
2. OBJETIVO	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO	33
3.2 MATERIAIS	33
3.2.1 Amostras	33
3.2.2 Padrão	34
3.2.3 Reagentes	34
3.2.4 Equipamentos e acessórios	34

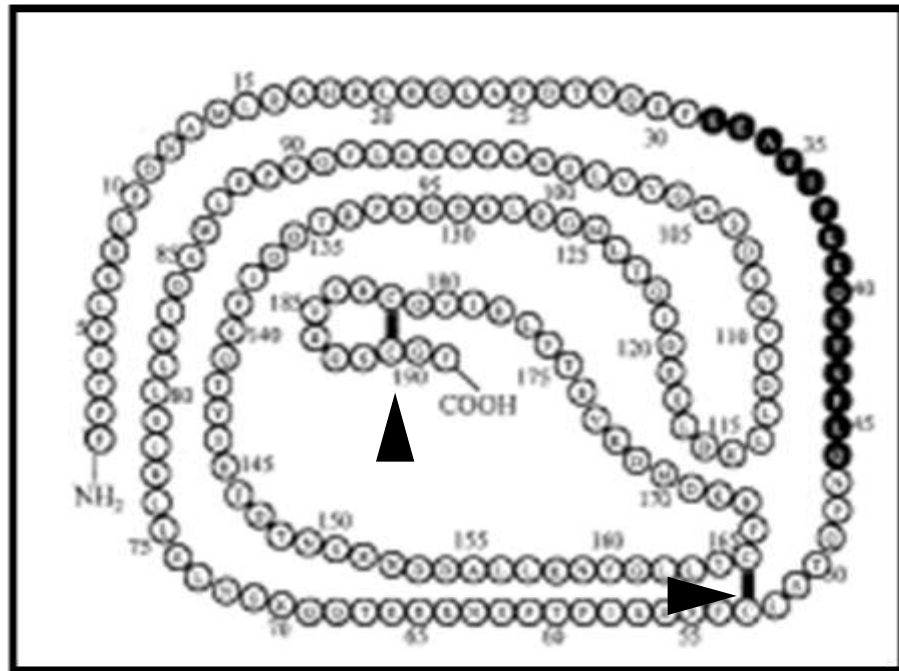
3.3 MÉTODOS	35
3.3.1 Identificação da somatropina a partir da determinação do seu peso molecular	35
3.3.1.1 <i>Preparo das amostras e padrão</i>	36
3.3.1.2 <i>Condições otimizadas para o desenvolvimento do método de identificação da somatropina a partir da determinação do seu peso molecular</i>	36
3.3.1.3 <i>Tratamento dos dados</i>	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ANÁLISE DA PROTEÍNA INTACTA	39
4.1.1 Identificação da somatropina a partir da determinação da massa molecular	39
4.1.2 Massas exatas encontradas e os erros em partes por milhão (ppm)	55
5. CONCLUSÃO	57
6. PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O hormônio do crescimento (do inglês GH ou somatropina) é produzido por células especializadas, os somatotrofos, localizadas na porção anterior da hipófise, também denominada de adeno-hipófise, sendo constituído por uma cadeia polipeptídica contendo 191 aminoácidos, duas pontes dissulfeto e com massa molecular de 22.125 daltons (Da) (Figura 1). A produção é controlada pelo hormônio liberador do hormônio de crescimento (do inglês GHRH) e pelo hormônio inibidor do hormônio de crescimento (do inglês GHIH, também denominado como somatostatina), ambos sintetizados pelo hipotálamo. O GH estimula o crescimento dos ossos, atua sobre o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, atuando também sobre o sistema nervoso central, levando a uma melhora das funções cognitivas, do humor, da memória e do sono. O hormônio do crescimento também exerce importante efeito sobre o sistema imunológico, levando ao aumento da resposta de macrófagos e linfócitos aos antígenos (AIRES, 2008).

Figura 1: Cadeia linear de aminoácidos da somatotropina. Setas: pontes dissulfeto.



Fonte: Bradley C. Nindl, William J. Kraemer, James O. Marx, Alexander P. Tuckow, and Wesley C. Hymer

A deficiência do hormônio de crescimento leva a manifestações clínicas e metabólicas diversas como: redução da massa e força musculares; aumento do tecido adiposo, tanto em nível subcutâneo quanto visceral; diminuição dos marcadores de formação óssea; reabsorção óssea; redução da atividade de remodelação óssea; e aumento dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (PORTES; BARBOSA, 2008). As causas da deficiência podem ser idiopáticas, congênicas ou adquiridas.

Os dados sobre a prevalência das pessoas acometidas no Brasil são insuficientes, mas estimativas indicam que existem 2.726 crianças menores de 16 anos na Inglaterra e 162 no País de Gales com essa deficiência. Nos Estados Unidos, a incidência da doença é de 1 para cada 3480 nascidos vivos (BRASIL, 2008).

O tratamento com hormônio de crescimento tem sido realizado desde o final dos anos 50, sendo utilizado até o início dos anos 80 com GH extraído de um macerado de cérebro de cadáveres humanos. Somente após 1985, com o advento

da tecnologia do DNA recombinante, houve uma maior disponibilidade deste hormônio para o tratamento dos distúrbios relacionados à sua deficiência. (PORTES; BARBOSA, 2008).

1.2 OS BIOFÁRMACOS

Os biofármacos são produtos farmacêuticos de origem biológica, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. Os biofármacos podem ser elaborados utilizando matérias-primas procedentes de um componente ativo de origem biológica ou de um componente ativo de origem biotecnológica. A diferença entre os dois está no fato de que os componentes de origem biotecnológica são obtidos a partir de células modificadas geneticamente para produzir o biofármaco em questão. Dentre os biofármacos mais importantes são encontrados os hormônios como a insulina e o hormônio de crescimento (ROCHE, 2014).

A primeira proteína a ser utilizada com fins terapêuticos foi a insulina, extraída do pâncreas de suínos, passando a ser obtida através da tecnologia do DNA recombinante a partir do início dos anos 80. O hormônio de crescimento recombinante humano (rhGH) passou a ser obtido pela mesma tecnologia pouco tempo depois, o que aumentou a qualidade dos produtos obtidos, reduzindo os problemas relacionados à contaminação por príons nos produtos originados de extratos de tecido humano (HOUDEBINE, 2009).

A indústria farmacêutica investe milhões de dólares todos os anos na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Em 2005, os Estados Unidos investiu aproximadamente 51,3 bilhões de dólares na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, dos quais 18.5 bilhões foram para o desenvolvimento de biofármacos (ROCHE, 2014).

A produção de biofármacos necessita de uma validação mais restrita e avaliação permanente ao longo da cadeia produtiva devido à presença de diversos

parâmetros que podem levar a alterações no produto final. Um produto biológico chega a ser testado 250 vezes ou mais durante seu processo de produção para garantir a eficácia e segurança. Produtos químicos sofrem entre 40 e 50 testes durante o seu processo produtivo, o que demonstra a grande complexidade dos medicamentos biológicos (ROCHE, 2014).

Para a produção de medicamentos biotecnológicos são necessárias algumas etapas, como a modificação genética da célula ou micro-organismo para introdução do material genético que levará a produção do biofármaco; a célula ou micro-organismo é cultivado, aumentando o seu número e capacidade produtiva. Posteriormente, inicia-se a extração do produto biológico junto com todos os outros materiais celulares e resíduos remanescentes do meio de cultivo, seguindo-se com a etapa de purificação para que o produto desejado esteja totalmente livre de qualquer contaminante. É importante que o produto seja resultante de um processo validado e amplamente controlado ao longo de todas as suas etapas (ROCHE, 2014).

A imunogenicidade é um ponto importante e representa a preocupação com segurança mais importante relacionada aos biofármacos. Nesse processo, o corpo humano inicia uma resposta à introdução de um produto estranho, como uma proteína. Há produção de anticorpos que se ligam às proteínas estranhas, inativando-as e formando complexos antígeno-anticorpo que podem levar a diversas complicações e reações adversas. A alteração de um só aminoácido, um radical, uma fração da macromolécula, pode afetar significativamente a função, farmacocinética e farmacodinâmica, imunogenicidade e atividade dos produtos de origem biológica/biotecnológica (ROCHE, 2014).

1.3 A BIOTECNOLOGIA E OS SISTEMAS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A biotecnologia permite que organismos vivos sejam utilizados na produção de medicamentos baseados em proteínas, vitaminas e ácidos nucleicos, permitindo também a produção em larga escala e a elaboração de produtos específicos para determinadas doenças que não possuem terapia ou que possuem, mas não são eficazes para tal tratamento. Os produtos biotecnológicos oferecem medicamentos recombinantes mais seguros, reduzem os efeitos secundários e melhoram as terapias existentes no tratamento de doenças importantes, como a esclerose múltipla, diabetes e a deficiência do hormônio de crescimento (ROCHE, 2014).

Diferentes sistemas podem ser utilizados na produção de proteínas recombinantes (Tabela 1). A escolha deve estar baseada de acordo com estratégias de clonagem e expressão de proteínas, organismo hospedeiro e a localização celular da proteína de interesse, tendo em vista a produção do produto desejado com a pureza, atividade biológica requerida e relação custo/benefício aceitável. As características estruturais e químicas da proteína em sua forma nativa definem claramente a estratégia para a sua síntese através do uso da tecnologia do DNA recombinante. Podem ser utilizadas células bacterianas, leveduras, sistema celular baculovirus-Sf9 de insetos, células animais (particularmente, células de ovário de hamster chinês - CHO), plantas e animais transgênicos. A produção do hormônio de crescimento recombinante para uso humano é feita a partir da utilização de células bacterianas (HOUDEBINE, 2009).

Tabela 1: Informações sobre os diferentes sistemas utilizados na produção de proteínas recombinantes

Sistemas	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Bacterias	Regulamentação definida; genética conhecida; fácil e	Proteínas não são secretadas usualmente; contém endotoxinas; não	Insulina; hormônio de crescimento; fator de

	barato para crescer.	ocorrem modificações pós-traducionais.	crescimento.
Leveduras	Conhecido como “seguro”; histórico de uso; rápido; barato; modificações pós-traducionais.	Glicosilação pode arruinar a bioatividade; segurança; potência; pureza; contém imunogênicos e antígenos.	Vacinas recombinantes; vacina hepatite B viral; insulina humana.
Células de insetos	Modificações traducionais; proteínas enveladas corretamente; níveis de expressão fracos.	Regulamentação incompleta; crescimento lento; meio caro; infecção por baculovirus (etapa extra); vírus humanos podem infectar as células.	Método relativamente novo.
Células humanas	Usualmente as proteínas são enveladas corretamente; modificações pós-traducionais corretas; bom histórico de regulamentação; única opção no caso de proteínas grandes.	Método caro; crescimento lento; pode conter alergênicos e contaminantes; purificação complicada.	Ativador plasminogênico de tecido; fator VII (glicoproteína); anticorpos monoclonais.
Animais transgênicos	Processamento de proteína complexa; excelentes níveis de expressão; escala fácil; baixo custo de produção.	Pouca experiência em regulamentação; potencial para contaminação viral; escalas demoradas/longas; isolamento/GMP's na fazenda (local de criação)	Lipase (coelhos, ovelhas); Hormonio de crescimento (cabras); fator VIII (gado)
Plantas transgênicas	Ciclos de desenvolvimento pequenos; fácil armazenagem das sementes; bom nível de expressão; não existe conhecimento sobre vírus de planta que tenha contaminado humanos	Apresenta potencial para novos contaminantes (fungos, bactérias e pesticidas); modificações pós-traducionais; possibilidade de conter alergênicos	Vacina cólera (tabaco); lipase gástrica (milho); Hepatite B (batata).

1.4 O PROGRAMA DE MEDICAMENTOS DE DISPENSAÇÃO EM CARÁTER EXCEPCIONAL

A lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990 que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências, estabelece em seu artigo sexto que a execução da ação de assistência terapêutica integral, inclusive farmacêutica está incluída no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS). Isso contribuiu para que fosse criada uma política que incorporasse as prerrogativas estabelecidas pelo SUS na área da assistência farmacêutica, levando a criação da Política Nacional de Medicamentos em 1998. A ampliação da assistência farmacêutica, com crescimento da lista de medicamentos ofertados, abriu espaço para a entrada dos medicamentos que, posteriormente, viriam a ser denominados de “excepcionais”, medicamentos de elevado valor unitário ou que, pela duração do tratamento, tornam-se excessivamente caros. O Programa de Medicamentos de Dispensação em Caráter Excepcional do Sistema Único de Saúde é responsável por um grupo de medicamentos destinados ao tratamento de patologias específicas que atingem um número limitado de pacientes, os quais, na maioria das vezes utilizamos por períodos prolongados como, por exemplo, o hormônio de crescimento (BRASIL, 2004).

O Ministério da Saúde possui um protocolo clínico de diretrizes terapêuticas para o tratamento da deficiência do hormônio de crescimento e nele consta que o tratamento é indicado para crianças com deficiência caracterizada por apresentarem baixa estatura e velocidade de crescimento abaixo do normal. Atualmente, a somatropina está disponível no Sistema Único de Saúde nas apresentações de 4 unidades internacionais (UI) e 12 UI frasco-ampola/seringa, na forma de pó liofilizado que, após reconstituído, é administrado por via subcutânea uma vez ao dia por 6 a 7 dias na semana. Os preços dos medicamentos variam de acordo com a sua forma de apresentação, encontrando valores de R\$ 20,78 até R\$ 1338,73 (BRASIL, 2008).

Segundo o último relatório da Câmara de Regulação de Medicamentos (CMED) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), atualizado em 22 de novembro de 2014, existem oito laboratórios que fornecem o medicamento para compras públicas (Tabela 2) (ANVISA, 2014).

Tabela 2: Fornecedores, nomes comerciais e formulações do hormônio de crescimento disponíveis para compras públicas

Fornecedor	Nome comercial	Formulação
BIOSINTÉTICA FARMACÊUTICA LTDA	BIOMATROP	16 UI PO LIOF INJ CT FA + AMP DIL 1 ML
MERCK S/A	SAIZEN	1,33 MG PO LIOF INJ CT 1 FA VD INC + AMP DIL X 1 ML
NOVO NORDISK FARMACÊUTICA DO BRASIL LTDA	NORDITROPIN	10MG SOL INJ CT 1 CARP VD INC X 1,5 ML X 1 SIST APLIC PLAST
NOVO NORDISK FARMACÊUTICA DO BRASIL LTDA	NORDITROPIN	10 MG SOL INJ CT 1 CARP VD INC X 1,5 ML X 1 SIST APLIC PLAST.
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	12 UI SOL INJ CT 1 FA VD INC X 1,5 ML
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	12 UI PO LIOF CT FA VD INC + DIL BACTERIOSTATICO X 2ML
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	12 UI PO LIOF INJ CT FA VD INC
NOVO NORDISK FARMACÊUTICA DO BRASIL LTDA	NORDITROPIN	15 MG SOL INJ CT 1 CARP VD INC X 1,5 ML X 1 SIST APLIC PLAST .
ASPEN PHARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA	EUTROPIN	15 UI PO LIOF CT 1 FA VD INC + 1 FA VD INC SOL DIL X 1,5 ML
DISMÉDICA DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS HOSPITALARES E FARMACÊUTICOS LTDA	EUTROPIN	15 UI PO LIOF CT 1 FA VD INC + 1 FA VD INC SOL DIL X 1,5 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	16 UI PO LIOF INJ CT 1 BL PAP PLAS INC X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	16 UI PO LIOF INJ CT X 1 CANETA PREENCHIDA X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	16 UI PO LIOF INJ CT X 5 CANETAS PREENCHIDAS X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
SANDOZ DO BRASIL INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA	OMNITROPE	5 MG SOL INJ CT CARP VD INC X 1,5 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	36 UI PO LIOF INJ CT 1 BL PAP PLAS INC X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	36 UI PO LIOF INJ CT X 1

		CANETA PREENCHIDA X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
LABORATORIOS PFIZER LTDA.	GENOTROPIN	36 UI PO LIOF INJ CT X 5 CANETAS PREENCHIDAS X 1 FA VD INC DUPLO COMP + SOL DIL X 1 ML
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	4 UI SOL INJ CT 1 FA VD INC X 0,5 ML
ASPEN PHARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA	EUTROPIN	4 UI PO LIOF CT 1 FA VD INC + 1 FA VD INC SOL DIL X 1 ML
ASPEN PHARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA	EUTROPIN	4 UI PO LIOF CT 5 FA VD INC + 5 FA VD INC SOL DIL X 1 ML
DISMÉDICA DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS HOSPITALARES E FARMACÊUTICOS LTDA	EUTROPIN	4 UI PO LIOF CT 1 FA VD INC + 1 FA VD INC SOL DIL X 1 ML
DISMÉDICA DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS HOSPITALARES E FARMACÊUTICOS LTDA	EUTROPIN	4 UI PO LIOF CT 5 FA VD INC + 5 FA VD INC SOL DIL X 1 ML
BIOSINTÉTICA FARMACÊUTICA LTDA	BIOMATROP	4 UI PO LIOF INJ CT FA + AMP DIL 1 ML
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	4 UI PO LIOF CT FA VD INC + DIL BACTERIOSTATICO X 1ML
LABORATÓRIO QUÍMICO FARMACÊUTICO BERGAMO LTDA	HORMOTROP	4 UI PO LIOF INJ CT FA VD INC
NOVO NORDISK FARMACÊUTICA DO BRASIL LTDA	NORDITROPIN	5 MG SOL INJ CT 1 CARP VD INC X 1,5 ML X 1 SIST APLIC PLAST.
MERCK S/A	SAIZEN	5,83 MG/ML SOL INJ FR AMP VD INC X 1,03 ML
SANDOZ DO BRASIL INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA	OMNITROPE	10 MG SOL INJ CT CARP VD INC X 1,5 ML
MERCK S/A	SAIZEN	8 MG PO LIOF INJ CT 1 FA VD INC + 1 FA VD INC DIL X 1 ML
MERCK S/A	SAIZEN	8 MG/ML SOL INJ FR AMP VD INC X 1,5 ML
MERCK S/A	SAIZEN	8 MG/ML SOL INJ FR AMP VD INC X 2,5 ML

Fonte: Anvisa

1.5 O PAPEL DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

A qualidade dos produtos fornecidos à população deve ser assegurada e, para isso, os órgãos de Vigilância Sanitária (VISA) utilizam ferramentas para que os

medicamentos sejam avaliados, evitando possíveis danos à saúde pública. Além disso, o alto custo de alguns medicamentos distribuídos à população também fortalece a necessidade de um controle eficaz na certificação de sua qualidade.

Dentre as ferramentas utilizadas pela VISA na garantia da qualidade dos produtos distribuídos à população estão as análises previstas em lei, cuja função é fornecer subsídios e completar o conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Sua missão consiste em contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária, realizando ações analítico-laboratoriais previstas na legislação sanitária, ou por demanda de órgãos oficiais, para assegurar a qualidade sanitária dos produtos distribuídos à população (INCQS, 2014).

Durante o período compreendido entre janeiro de 2010 e fevereiro de 2015, o laboratório de biológicos, artigos e insumos para a saúde do INCQS recebeu dez amostras de somatropina oriundas de análises fiscais. Todas as amostras recebidas tinham como motivo de apreensão efeitos adversos ao medicamento, como forte ardência, rubor, edema e dor no local da aplicação. Tal fato enfatiza a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia analítica eficaz para a identificação desses compostos e seu controle de qualidade.

1.6 A SOMATROPINA E OS COMPÊNDIOS OFICIAIS

Atualmente, apenas a Farmacopéia Europeia (FE) e a Farmacopéia Americana apresentam metodologias analíticas descritas para a identificação do hormônio de crescimento, conforme tabela 3.

Tabela 3: Relação dos compêndios oficiais e metodologias utilizadas para a identificação do hormônio de crescimento recombinante para uso humano.

Compêndio	Metodologias para identificação
<i>U.S.Pharmacopeia</i>	Cromatografia de fase reversa e mapa de peptídeos
<i>European Pharmacopoeia</i>	Eletroforese capilar, cromatografia de fase reversa e mapa de peptídeos
Farmacopeia Brasileira	Não apresenta metodologia descrita

Fonte: Arquivo pessoal

Embora a quinta edição da Farmacopeia Brasileira não apresente metodologia analítica descrita para a identificação da somatropina, a quarta edição do compêndio preconizava a realização da eletroforese com o teste de focalização isoeletrica e a cromatografia líquida de fase reversa para tal procedimento.

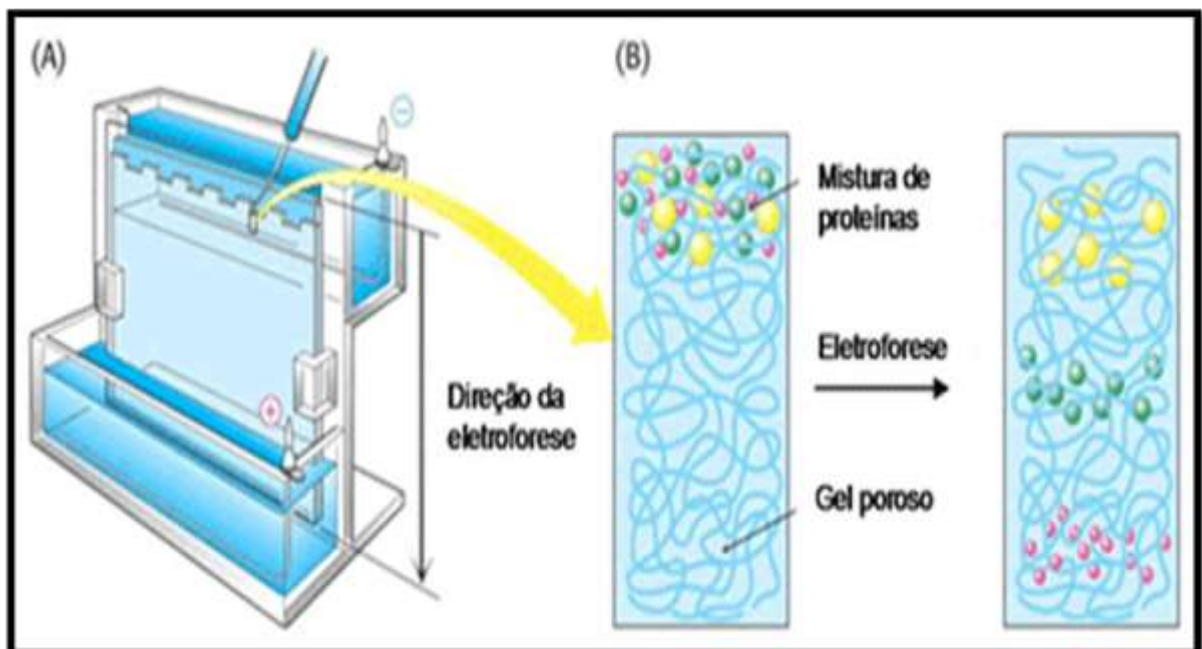
A carência de uma metodologia para identificação do composto no compêndio nacional fortalece a necessidade do desenvolvimento de técnicas para a identificação do hormônio de crescimento e, posteriormente, sua inclusão na literatura visando o aprimoramento do controle de qualidade desses produtos.

1.7 METODOLOGIAS ANALÍTICAS COMUMENTE UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DE PROTEÍNAS

As metodologias analíticas comumente utilizadas para a determinação do peso molecular de proteínas são a eletroforese em gel de poliacrilamida, a cromatografia líquida de exclusão molecular e a espectrometria de massas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida baseia-se na separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, mediante a sua migração pelo gel de poliacrilamida quando submetidas à corrente elétrica. As proteínas de menor peso migram mais e as de maior peso, menos (Figura 2). Esta técnica apresenta limitações devido a sua baixa resolução e pelo fato das proteínas serem separadas por faixa de peso, não sendo possível determiná-lo com exatidão.

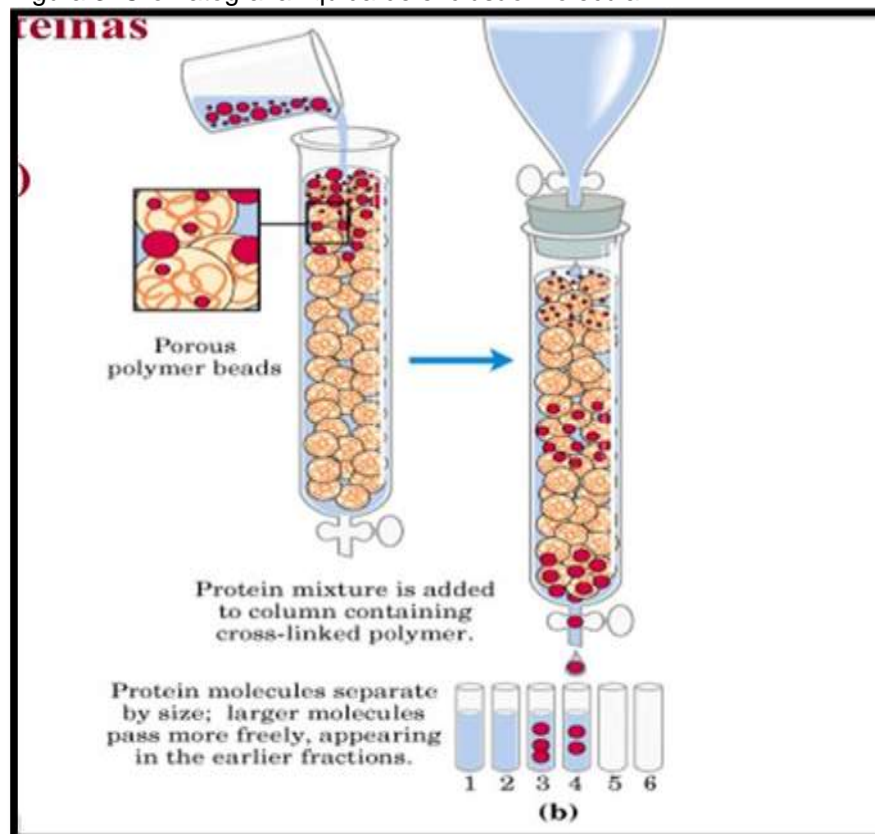
Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas



Fonte: http://www.centrocienciajunior.com/images/Uebelmg/Noticias/Img_151_393.gif

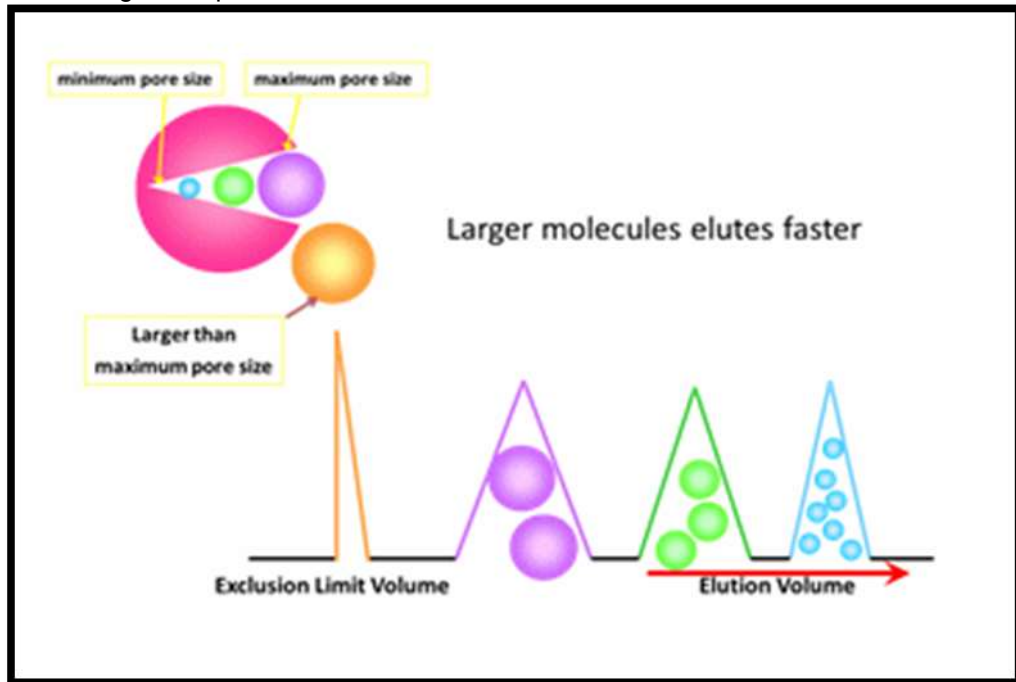
A cromatografia líquida de exclusão molecular consiste na separação dos analitos de acordo com seu tamanho, ao interagirem com a fase estacionária na coluna cromatográfica (Figura 3). Partículas maiores passam com maior facilidade, eluindo mais rapidamente. As partículas menores, por interagirem mais com a fase estacionária, permanecem por mais tempo na coluna, eluindo de forma mais lenta (Figura 4). As limitações desta técnica estão relacionadas ao fato de partículas com tamanho/peso semelhante apresentarem o mesmo tempo de retenção, não podendo ser separadas e identificadas.

Figura 3: Cromatografia líquida de exclusão molecular



Fonte: http://images.slideplayer.com.br/2/365311/slides/slide_5.jpg

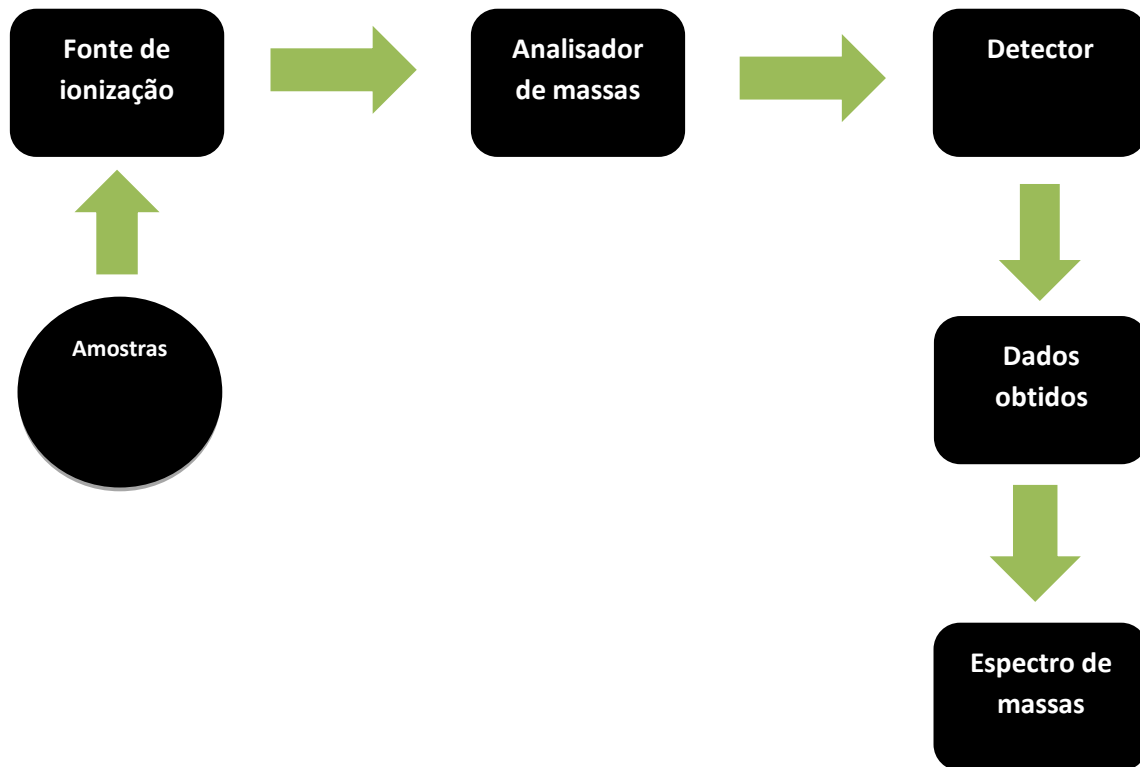
Figura 4: Ordem de eluição dos analitos de acordo com o seu tamanho na cromatografia líquida de exclusão molecular



Fonte: http://www.shodex.net/img/lesson_04_01d.gif

A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. O espectrômetro de massas é um equipamento constituído por um ionizador, um analisador de massas e um detector (Figura 5). Dentre os ionizadores, os mais utilizados na espectrometria de massas aplicada à proteínas são o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) e o *Electrospray* (ESI). Com relação aos analisadores de massas, os mais comumente utilizados são as armadilhas de íons (*ion-traps*), quadrupolos, tempo de voo (*time-of-flight* - TOF), *orbitrap* e *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR). Os analisadores podem ser utilizados sozinhos, ou associados em equipamentos conhecidos como híbridos, permitindo que as vantagens de cada um sejam aproveitadas. Dentre os detectores, os mais largamente utilizados são os eletromultiplicadores.

Figura 5: Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas.

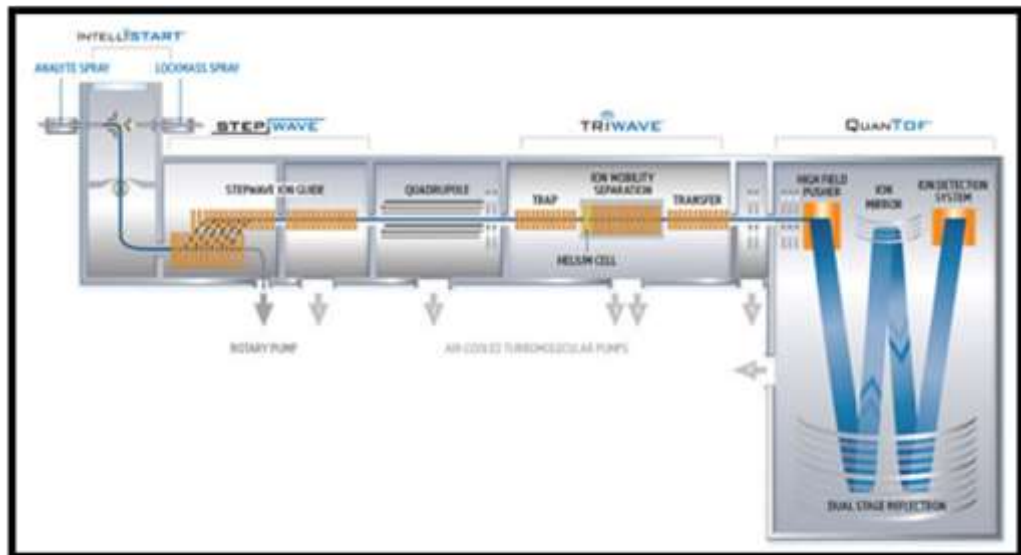


Fonte: Arquivo pessoal

O equipamento utilizado no experimento (Figura 6) consiste de um ionizador do tipo *electrospray*, analisadores do tipo quadrupolo e TOF (Q-TOF) e um detector do tipo eletromultiplicador. A ionização consiste na formação de um spray com pequenas gotículas contendo os compostos a serem analisados. O analisador do tipo quadrupolo contém um filtro de massa quadrupolar que focaliza os íons num intervalo específico de razões massa/carga, sendo assim transmitidos para o detector. O analisador do tipo tempo de voo separa os íons formados através do uso de diferentes velocidades assumidas por eles após serem acelerados por um potencial de voltagem. A velocidade é dependente da massa do íon e, desta forma, a razão massa/carga pode ser calculada a partir do tempo decorrido entre a irradiação e a detecção dos íons. O eletromultiplicador é um instrumento que multiplica uma corrente eletrônica por aceleração de elétrons na superfície de um eletrodo, a colisão libera um número maior de elétrons (secundários) que também

são acelerados na superfície de outro eletrodo (ou outra parte do mesmo eletrodo), liberando mais elétrons, amplificando o sinal.

Figura 6: Espectrômetro de massas modelo SYNAPT G2-S HDMS fabricado pela Waters Corporation.



Fonte: Waters Corporation

A espectrometria de massas, nesse contexto, apresenta-se como uma técnica eficaz pelo fato de possibilitar a determinação exata e inequívoca do peso molecular dos analitos, permitindo sua correta identificação. Além disso, com a espectrometria de massas é possível caracterizar moléculas proteicas mediante a realização do mapa de peptídeos, chegando à elucidação da sequência de aminoácidos dos compostos. É possível também avaliar as alterações pós traducionais presentes nas proteínas, verificação da presença de isoformas e a quantificação dos elementos.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é avaliar diferentes lotes de uma formulação de hormônio de crescimento recombinante para uso humano utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver uma metodologia analítica para identificação do hormônio de crescimento recombinante para uso humano a partir da determinação de sua massa molecular utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos para a Saúde, Setor de Imunobiológicos, Departamento de Química, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

3.2 MATERIAIS

3.2.1 Amostras

Foram utilizadas quatro amostras de lotes diferentes oriundas da rotina de análises do Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos para a Saúde, e pertencentes a um mesmo fabricante, codificadas como amostras 1, 2, 3 e 4.

3.2.2 Padrão

O padrão utilizado foi o *European Pharmacopoeia Reference Standard – Somatropin/desamidosomatropin resolution mixture* código Y0000711, lote 1.1 e Id 007R48.

3.2.3 Reagentes

- Ácido fórmico adquirido da Merck KGaA – Alemanha;
- Acetonitrila adquirida da Merck KGaA – Alemanha;
- Água ultra-pura milli-Q;

3.2.4 Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência modelo ACQUITY UPLC adquirido do fabricante Waters Corporation – EUA;
- Espectrômetro de massas modelo SYNAPT G2-S HDMS adquirido do fabricante Waters Corporation – EUA (Figura 5);
- Homogeneizador de tubos modelo Lab dancer adquirido do fabricante IKA® do Brasil – Brasil;
- Balança analítica modelo XS205 adquirida do fabricante Mettler Toledo – Suíça;

- Coluna MassPREP™ Micro Desalting adquirida do fabricante Waters Corporation – EUA.

Figura 7: Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas modelo SYNAPT G2-S HDMS fabricado pela Waters® Corporation.



Fonte: Arquivo pessoal

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Identificação da somatropina a partir da determinação do seu peso molecular

3.3.1.1 Preparo das amostras e padrão

Para a realização do experimento de identificação da somatropina a partir da determinação do seu peso molecular, o padrão e as amostras foram diluídos utilizando uma solução de ácido fórmico 0,1%, obtendo uma concentração de $50 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ para ambos. Foram preparadas duas replicatas para o padrão e as quatro amostras, sendo colocadas em diferentes *vials*.

3.3.1.2 Condições otimizadas para o desenvolvimento do método de identificação da somatropina a partir da determinação do seu peso molecular

As condições operacionais utilizadas no cromatógrafo líquido e no espectrômetro de massas para o desenvolvimento da metodologia encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições operacionais do cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas para análise da proteína intacta.

Cromatógrafo Líquido	
Modelo:	ACQUITY UPLC [®]
Fase móvel A2:	Água + 0,1% Ácido Fórmico
Fase móvel B2:	Acetonitrila + 0,1% Ácido Fórmico
Gradiente:	Conforme tabela 5
Tempo de Corrida:	10 min
Coluna:	MassPREP [™] Micro Desalting column Lote 186004032
Temperatura do forno da coluna:	80 °C
Volume de injeção:	10 μL
Espectrômetro de Massas	

Modelo:	SYNAPT® G2-S HDMS
Modo de ionização:	ESI +
Capilar:	3.2 kV
Cone:	40 V
Temperatura de Dessolvatação:	350 °C
Temperatura da Fonte:	150 °C
Gás de Dessolvatação (N ₂):	800 L/h
Faixa de aquisição:	500 – 3000 m/z

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 5: Gradiente de concentração utilizado na cromatografia líquida de ultra eficiência

Tempo (min)	Fluxo	% A	% B
0.00	0.200	95.0	5.0
0.50	0.200	90.0	10.0
0.51	0.200	80.0	20.0
7.10	0.200	55.0	45.0
7.20	0.200	5.0	95.0
7.30	0.200	95.0	5.0
7.40	0.200	5.0	95.0
7.50	0.200	95.0	5.0
7.60	0.200	5.0	95.0
7.70	0.200	95.0	5.0
7.80	0.200	5.0	95.0
10.00	0.200	95.0	5.0

Fonte: Arquivo pessoal

3.3.1.3 *Tratamento dos dados*

Os dados obtidos no experimento foram analisados mediante a utilização do software *Biopharmalynx*® versão 1.3.2, adquirido da Waters Corporation – EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

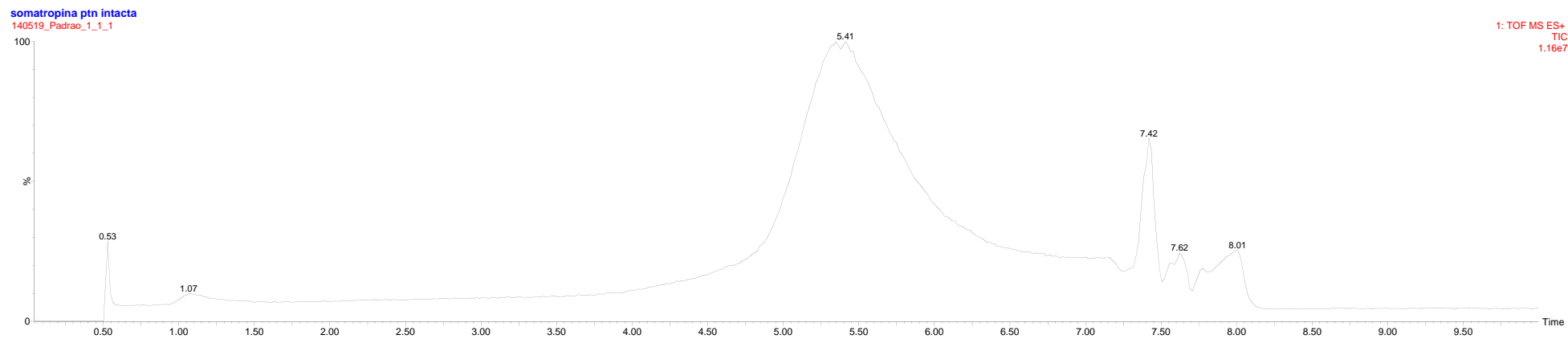
4.1 ANÁLISE DA PROTEÍNA INTACTA

4.1.1 Identificação da somatropina a partir da determinação da massa molecular

Segundo a FE, a identificação da somatropina é feita pela técnica de eletroforese capilar com a obtenção de um eletroferograma com apenas um pico principal correspondente ao hormônio. Outro parâmetro avaliado é o tempo de retenção encontrado no padrão e nas amostras, preconizado no compêndio como sendo de 5 minutos. Com a utilização do espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra eficiência foram obtidos cromatogramas contendo um sinal cromatográfico majoritário para o padrão e amostras, todos com tempo de retenção de 5 minutos (Figuras 8-17). Nas figura 18, 19 e 28 encontram-se os espectros obtidos para as replicatas do padrão, nas figuras 20, 21 e 29 para as replicatas da amostra 1, nas figuras 22, 23 e 30 para as replicatas da amostra 2, nas figuras 24, 25 e 31 para as replicatas da amostra 3 e nas figuras 26, 27 e 32 para as replicatas da amostra 4.

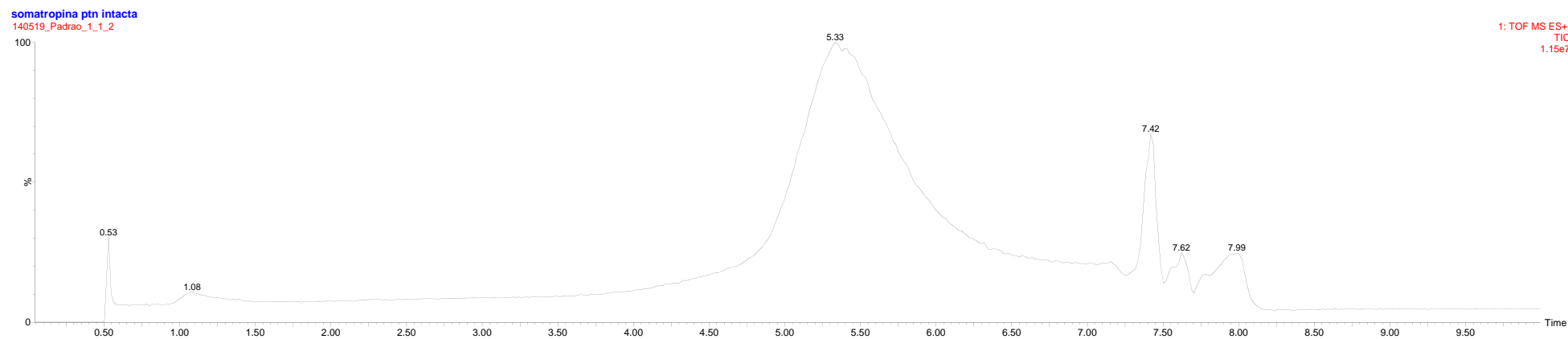
As figuras 28 a 32 apresentam os espectros deconvoluídos para as replicatas do padrão farmacopeico e amostras, nos quais podem ser observados os picos majoritários correspondentes ao analito em questão.

Figura 8: Cromatograma obtido para primeira replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

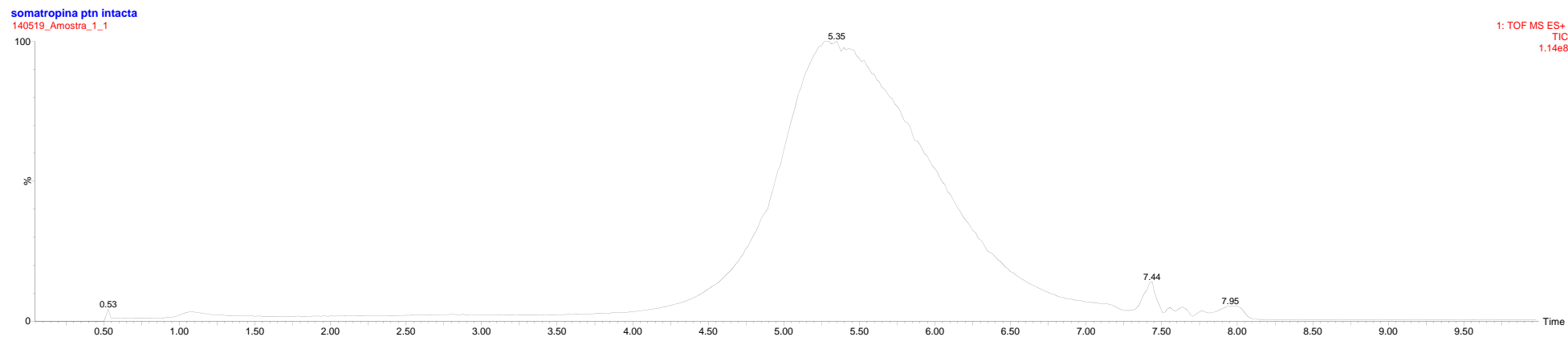


Fonte: Arquivo Pessoal

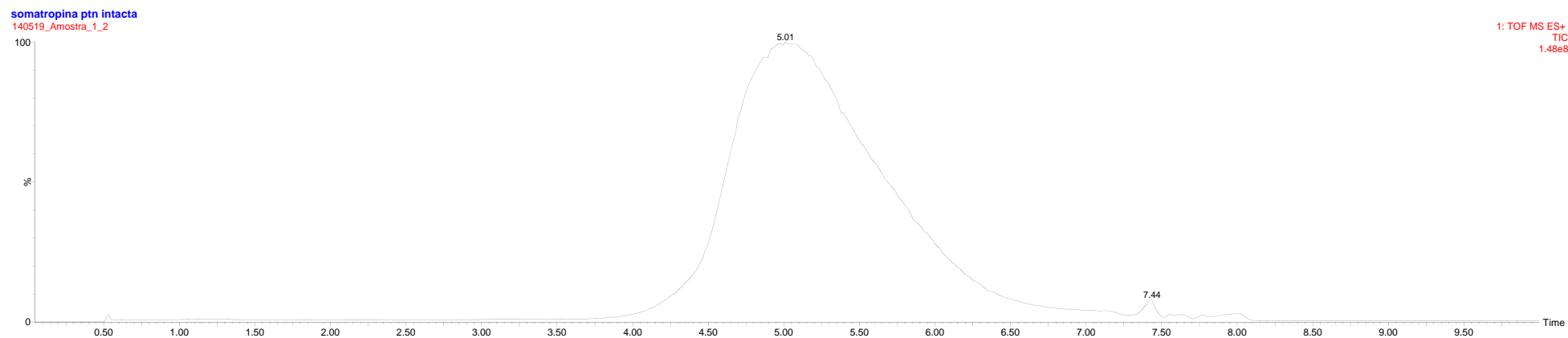
Figura 9: Cromatograma obtido para segunda replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 1 utilizada de concentração 50 μ g. μ L.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 11: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 1 utilizada de concentração 50 μ g. μ L.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 12: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 2 utilizada de concentração 50µg.µL.

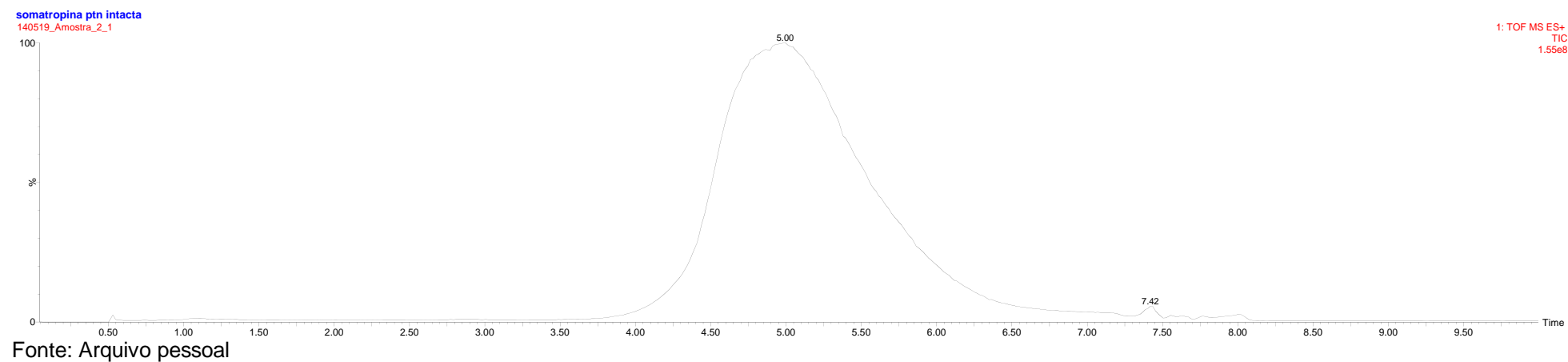


Figura 13: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 2 utilizada de concentração 50µg.µL.

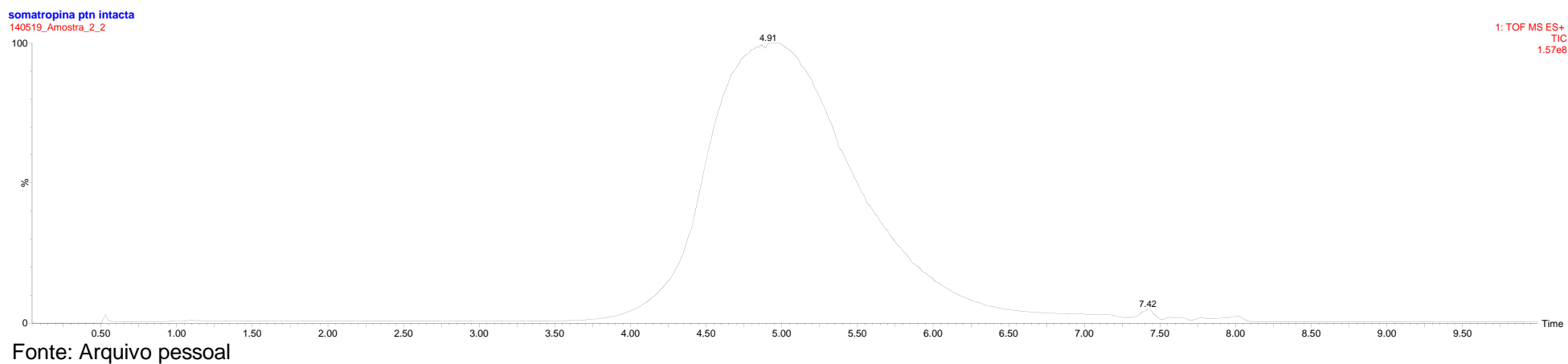
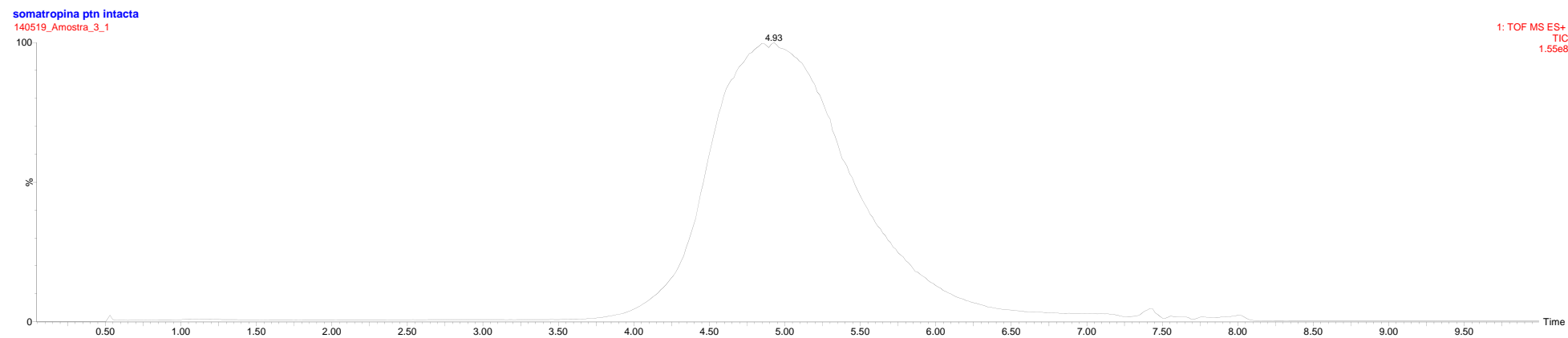
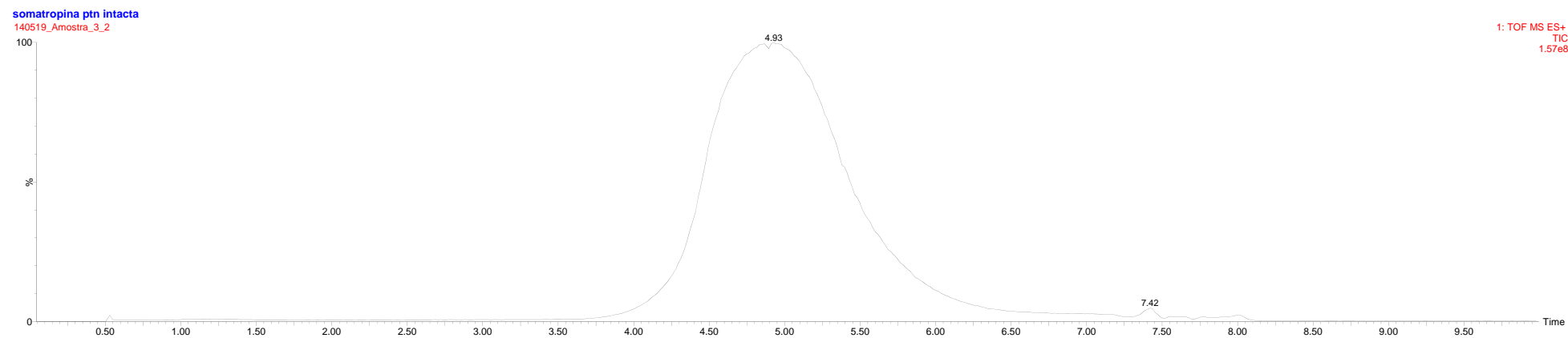


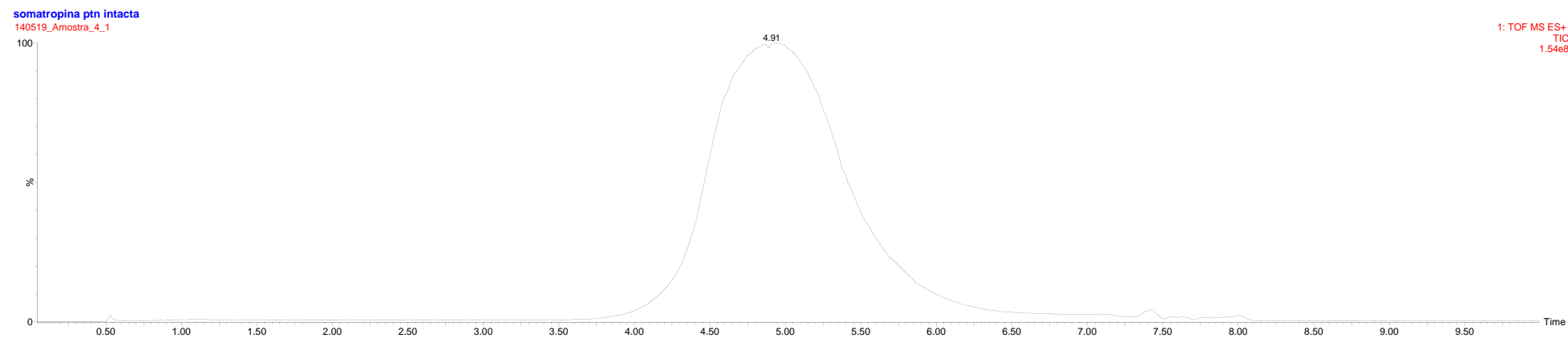
Figura 14: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 3 utilizada de concentração 50 μ g. μ L.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 15: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 3 utilizada de concentração 50 μ g. μ L.

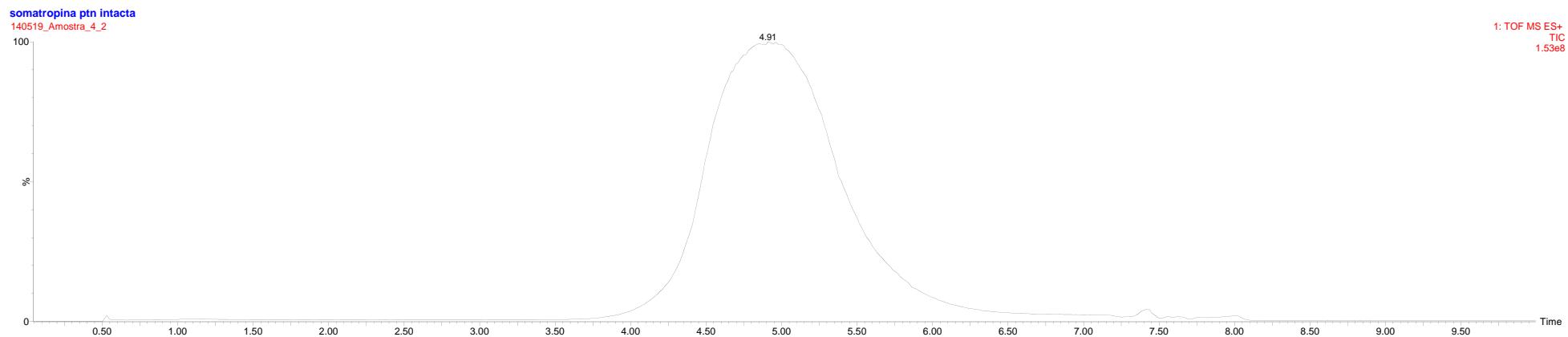
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 16: Cromatograma obtido para primeira replicata da amostra 4 utilizada de concentração 50µg.µL.



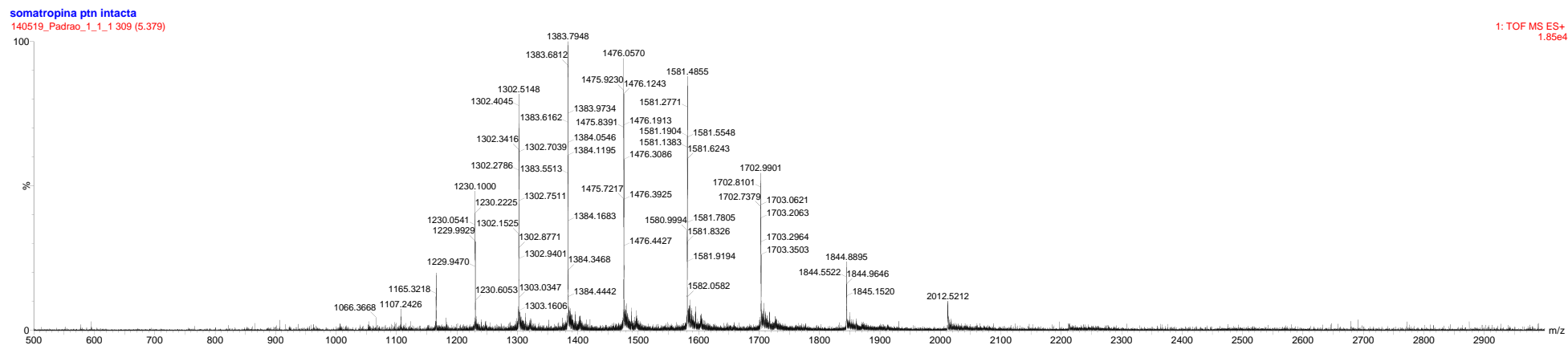
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 17: Cromatograma obtido para segunda replicata da amostra 4 utilizada de concentração 50µg.µL.



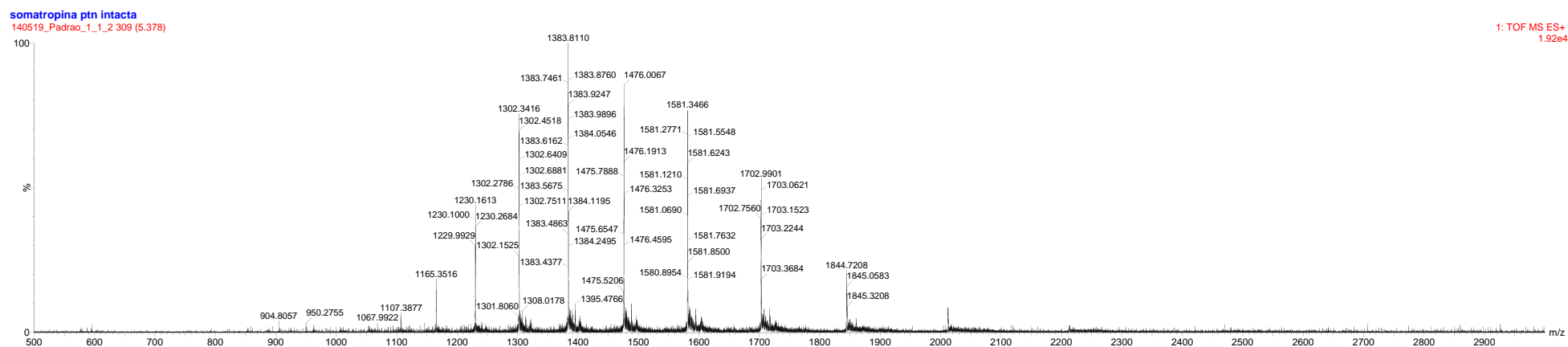
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 18: Espectro não deconvoluído obtido para primeira replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração 50µg.µL.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 19: Espectro não deconvoluído obtido para segunda replicata do padrão farmacopeico utilizado de concentração 50µg.µL.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 20: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 1 utilizada de concentração 50µg.µL.

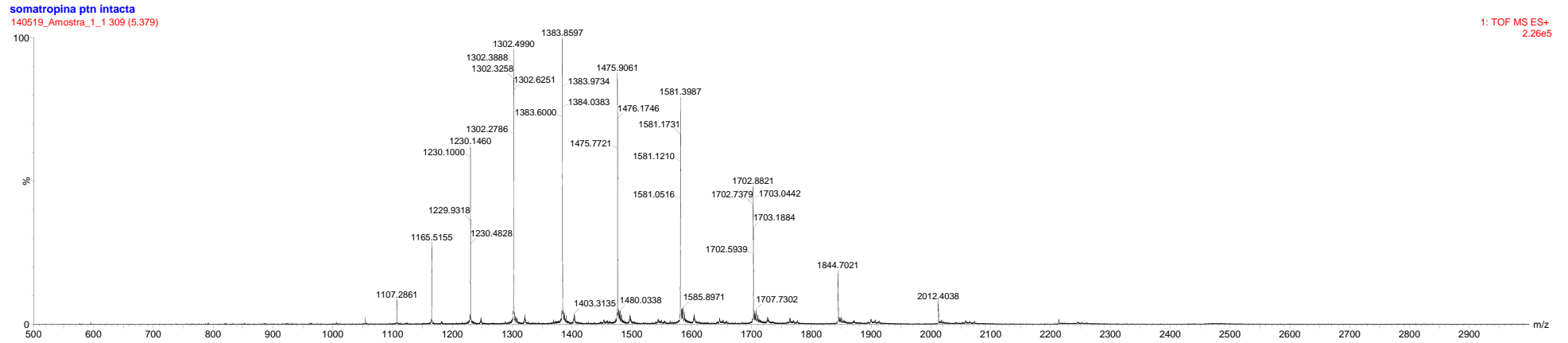


Figura 21: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 1 utilizada de concentração 50µg.µL.

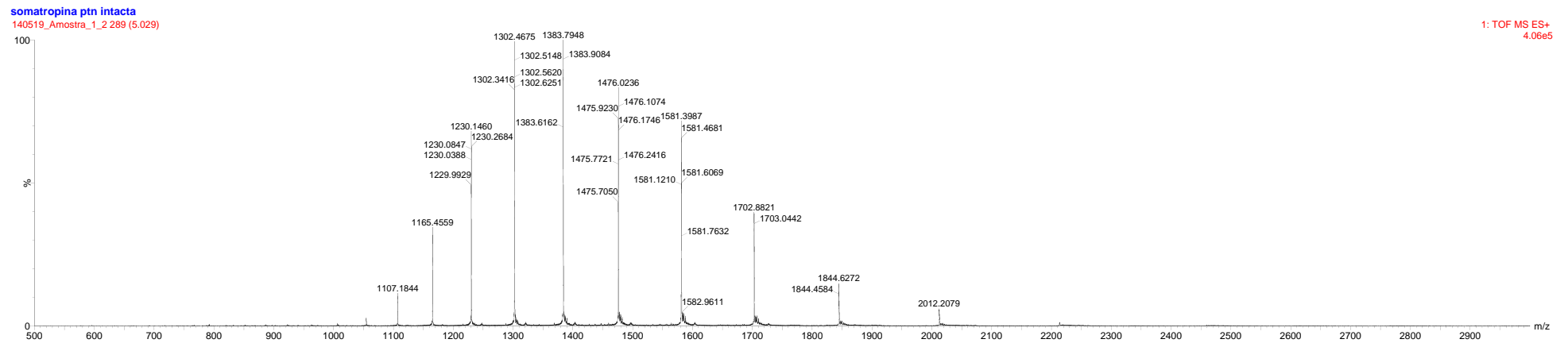
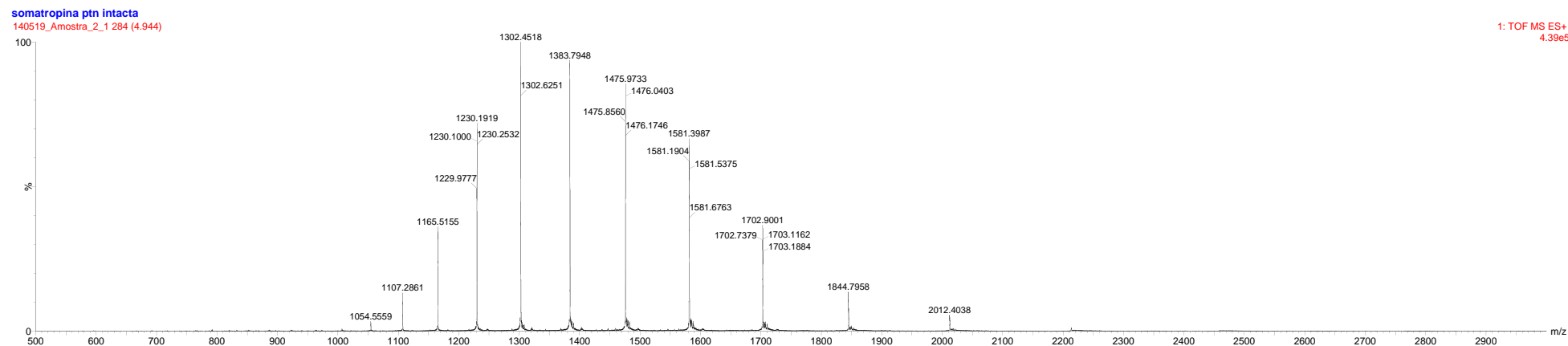
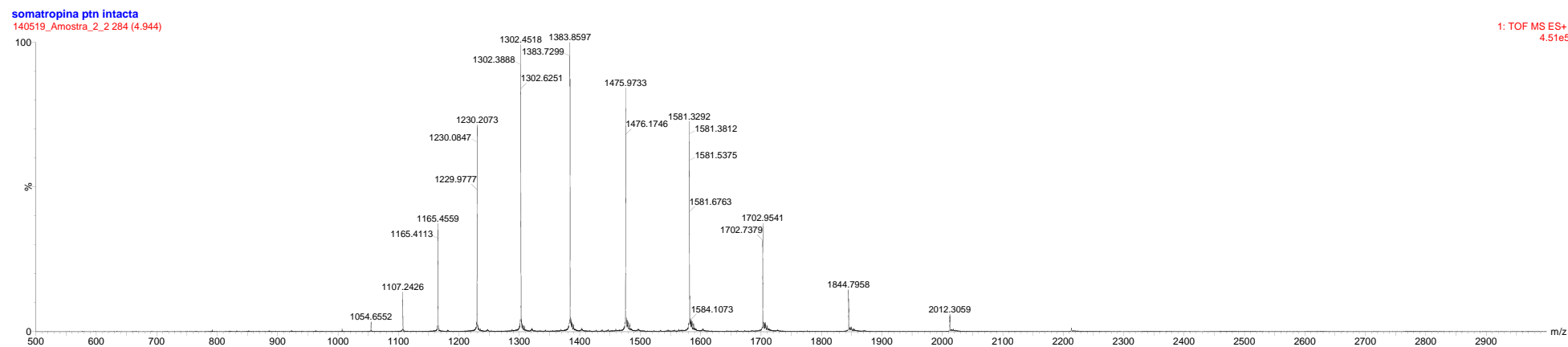


Figura 22: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 2 utilizada de concentração 50µg.µL.



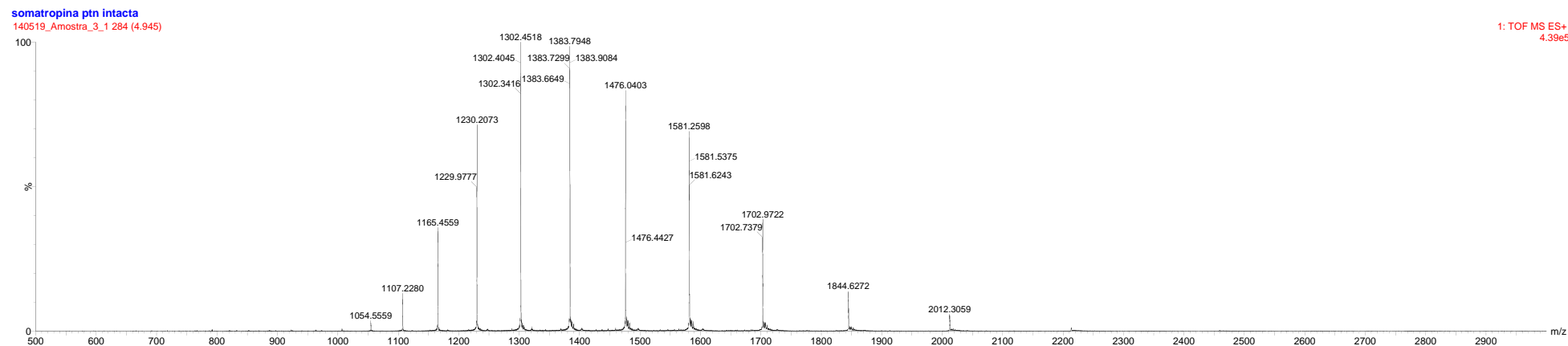
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 23: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 2 utilizada de concentração 50µg.µL.



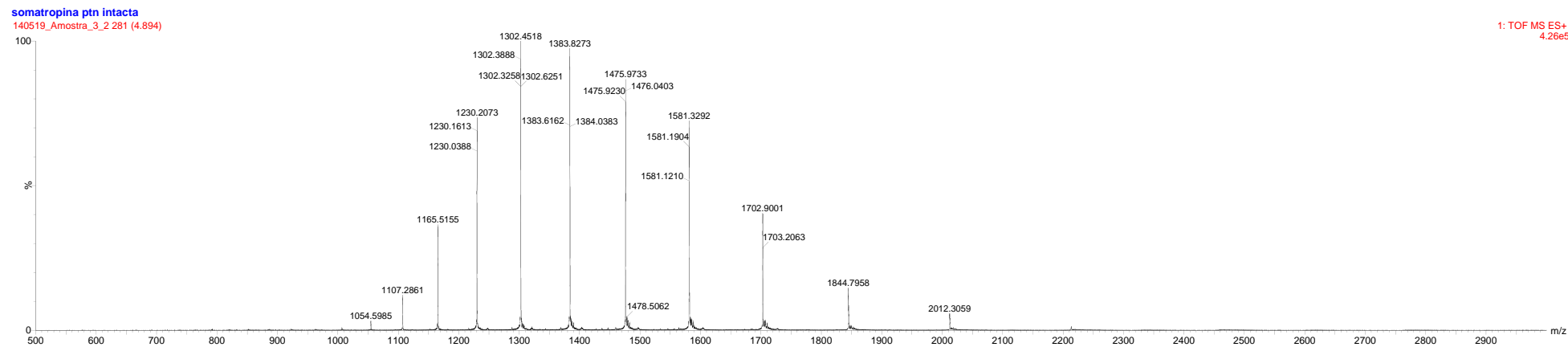
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 24: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 3 utilizada de concentração 50µg.µL.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 25: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 3 utilizada de concentração 50µg.µL.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 26: Espectro não deconvoluído obtido para a primeira replicata da amostra 4 utilizada de concentração 50µg.µL.

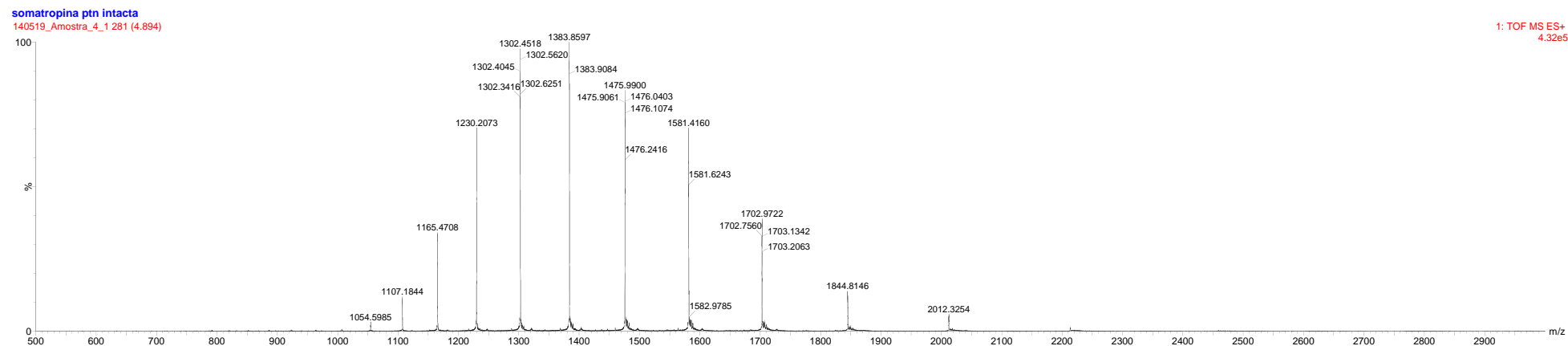


Figura 27: Espectro não deconvoluído obtido para a segunda replicata da amostra 4 utilizada de concentração 50µg.µL.

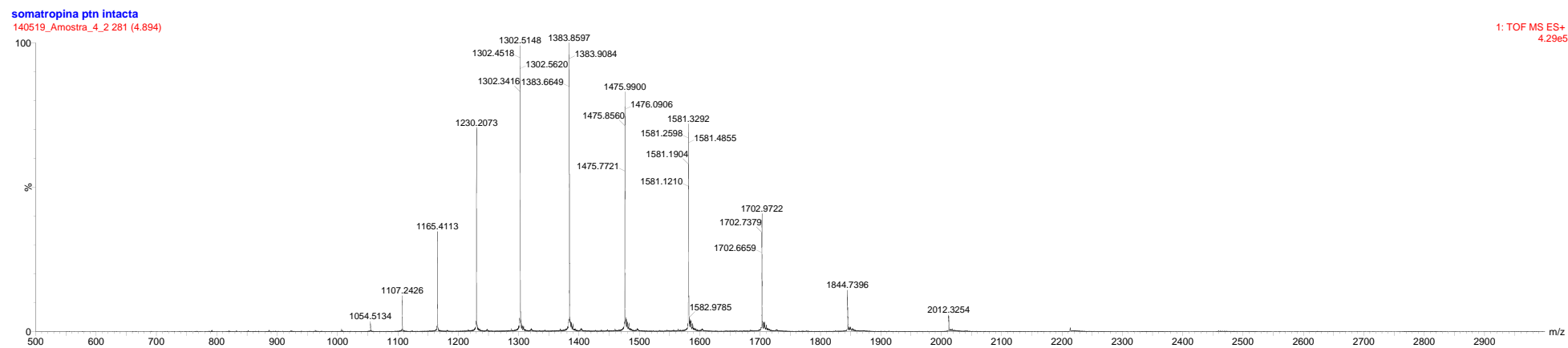


Figura 28: (A) Espectros obtidos para as replicatas do padrão farmacopeico utilizado de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.



Fonte: Arquivo pessoal

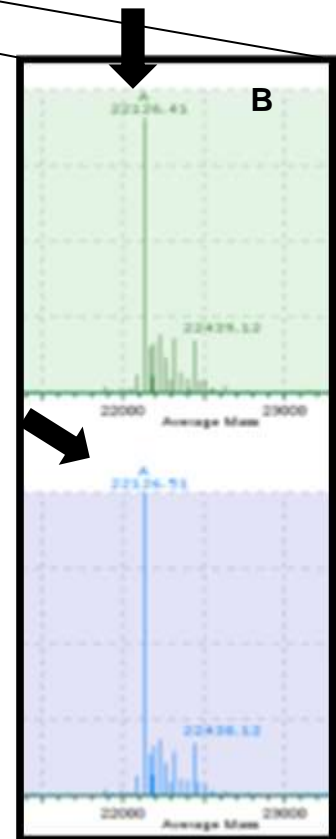
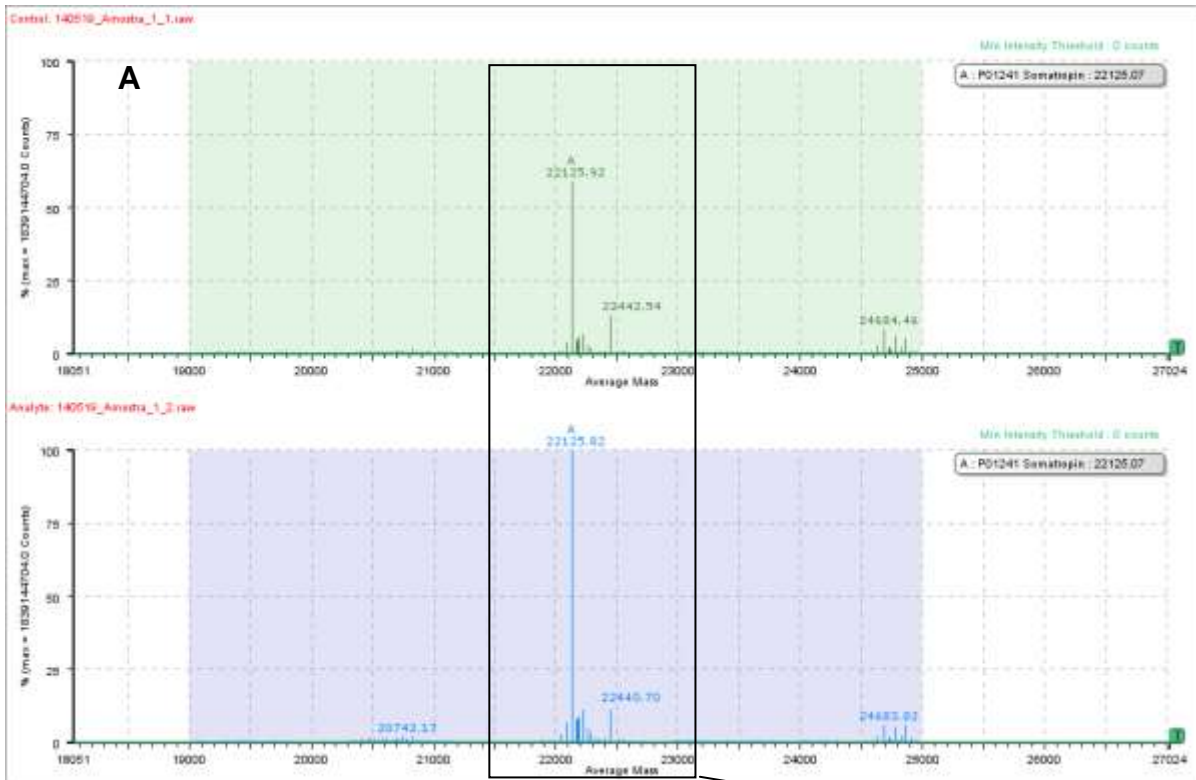


Figura 29: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 1 de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.



Fonte: Arquivo pessoal

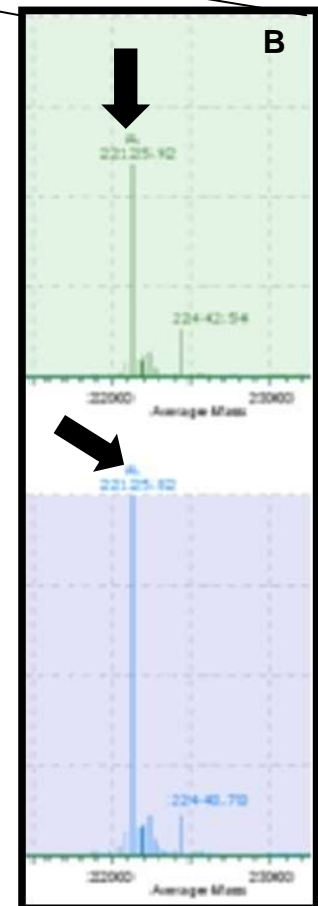
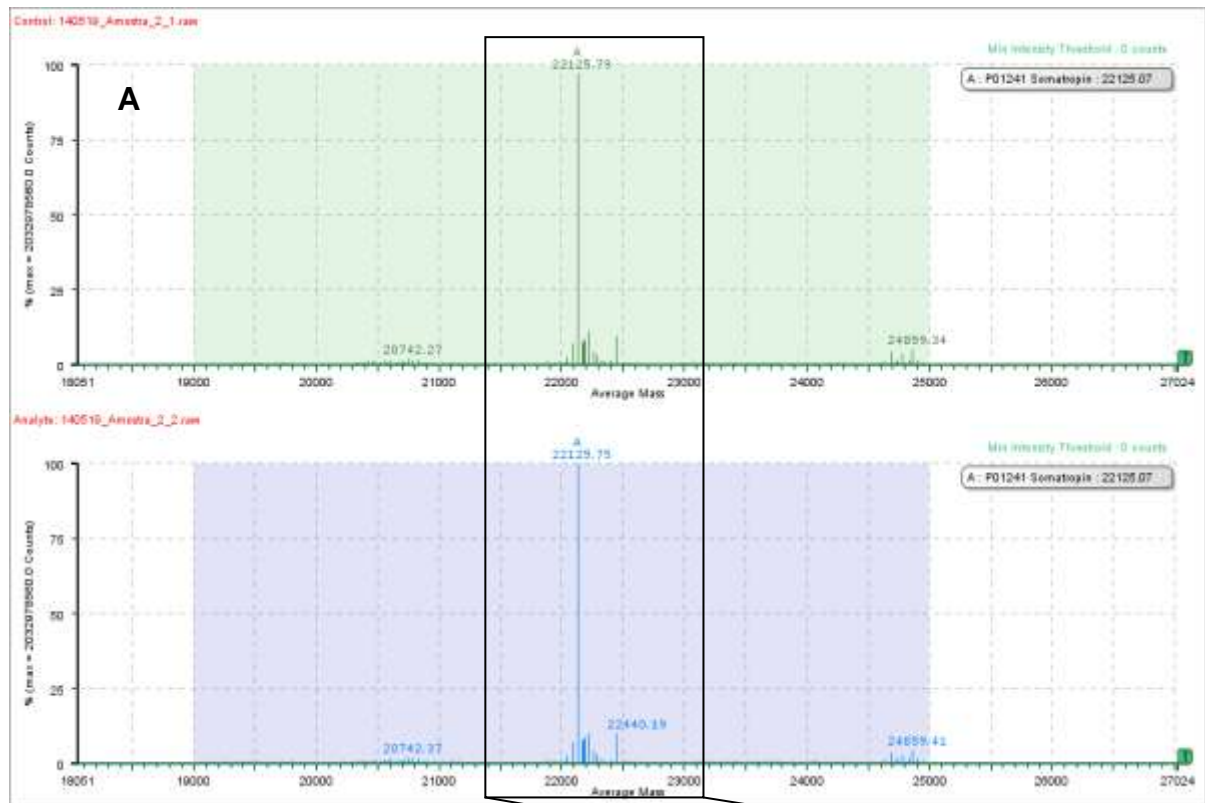


Figura 30: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 2 de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.



Fonte: Arquivo pessoal

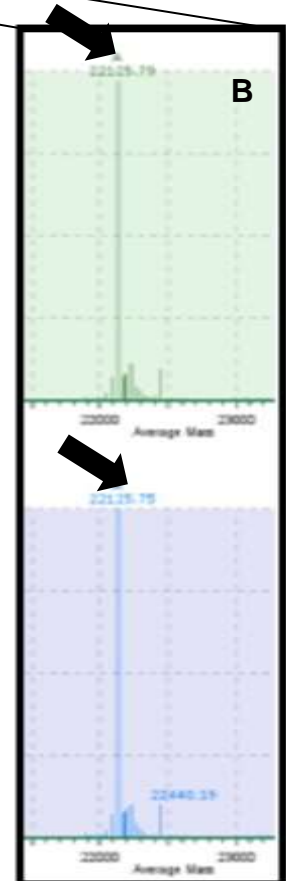
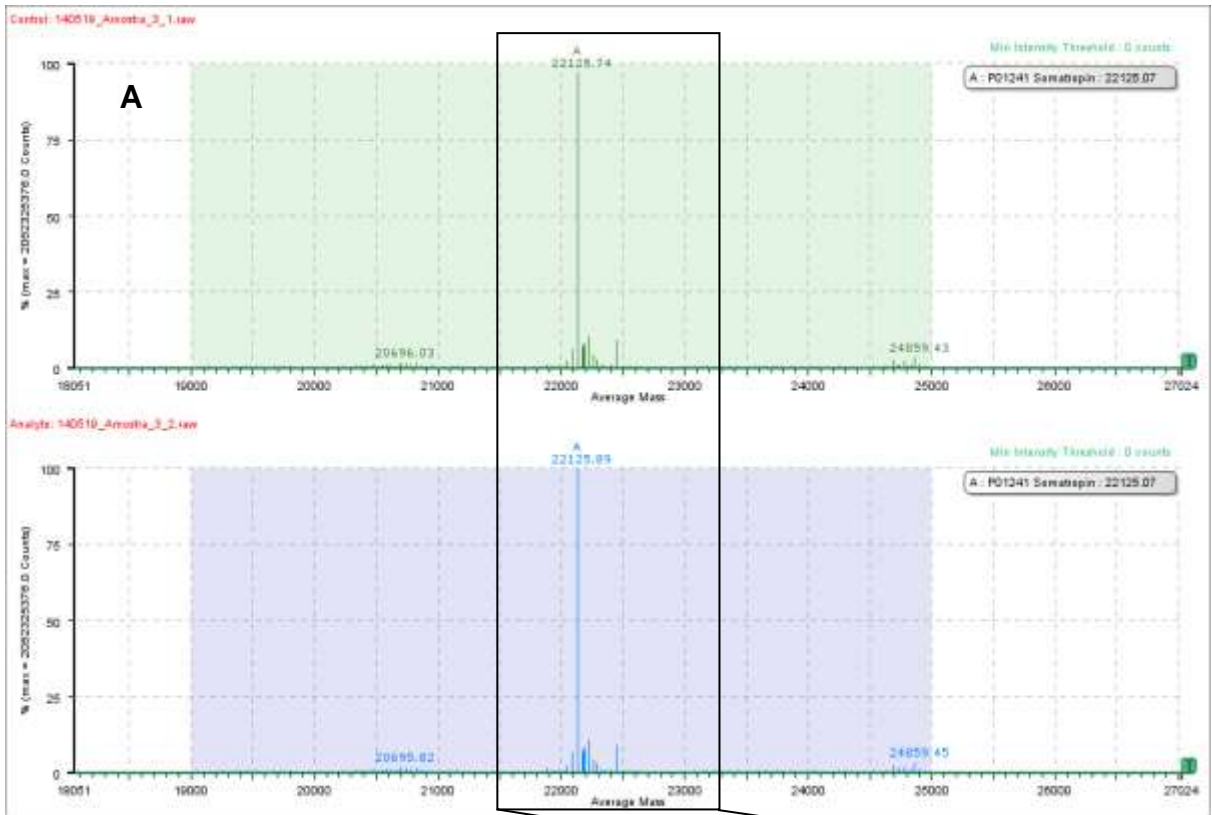


Figura 31: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 3 de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.



Fonte: Arquivo pessoal

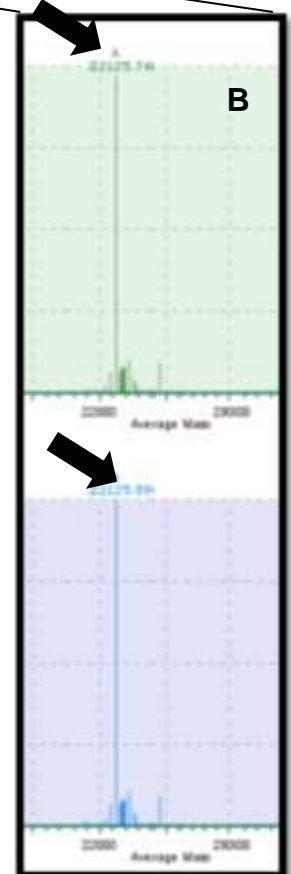
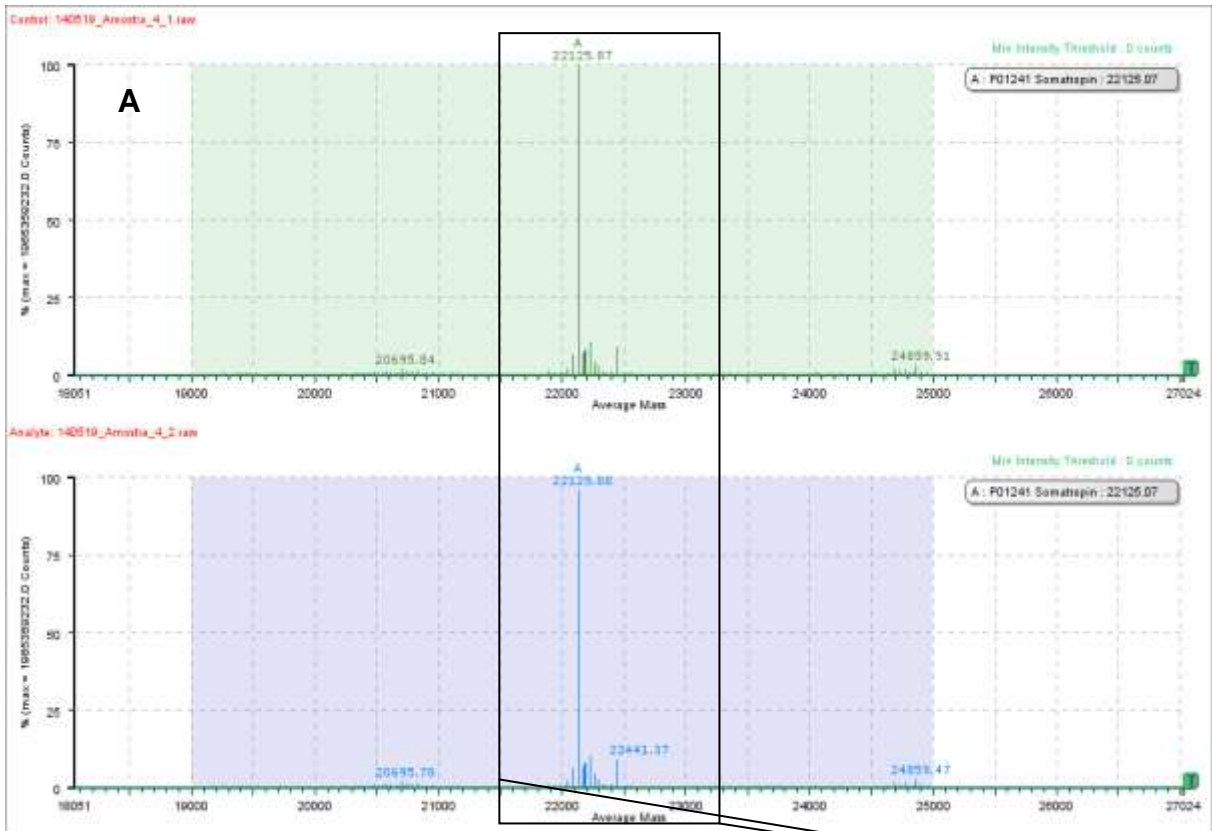
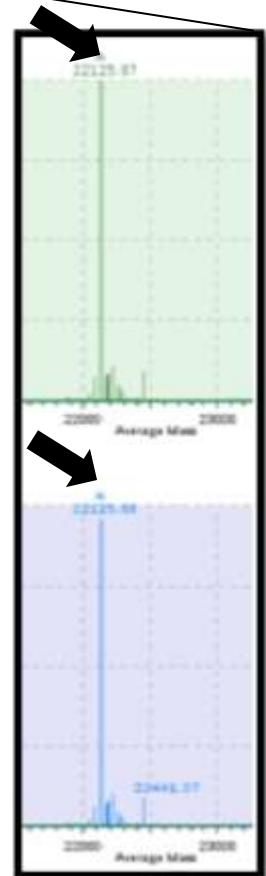


Figura 32: (A) Espectros obtidos para as replicatas da amostra 4 de concentração $50\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. (B) Zoom da região do íon precursor da somatropina.



Fonte: Arquivo pessoal



Para as replicatas do padrão foram encontrados picos majoritários de massa 22126,41 Da e 22126,51 Da, para as replicatas da amostra 1 foram encontrados valores de 22125,92 Da e 22125,82 Da, para as replicatas da amostra 2 foram encontrados os valores de 22125,79 Da e 22125,75 Da, para as replicatas da amostra 3 foram encontrados os valores de 22125,74 Da e 22125,89 Da, e para as replicatas da amostra 4 foram encontrados os valores de 22125,87 Da e 22125,88 Da. Os resultados encontrados permitiram a identificação da somatropina nas amostras analisadas em conformidade com o padrão utilizado, de acordo com a massa preconizada pela FE de 22125 Da. Nos espectros também podem ser observados picos adicionais identificados pelo equipamento, que podem indicar variantes da somatropina, isoformas e compostos degradados. Algumas replicatas apresentaram variação entre os picos apresentados, o que pode ser explicado pelo fato das replicatas terem sido preparadas em diferentes *vials*.

4.1.2 Massas exatas encontradas e os erros em partes por milhão (ppm)

A exatidão da massa é calculada como a diferença (erro) entre a massa medida (experimental) e a massa teórica, podendo ser medida em miliDaltons (1mDa = 0.001 unidades de massa) ou em partes por milhão (ppm) ($\Delta m/m \times 10^6$). Quanto menor for o erro calculado, maior será a exatidão na determinação da massa no experimento e maior será a segurança na identificação da proteína.

Exemplo:

Massa real: 400.0000

Massa medida: 400.0020

Diferença: 0.0020 (2 mDa)

Erro em ppm: $0.0020 / 400 \times 10^6 = 5\text{ppm}$ ($\Delta m/m \times 10^6$)

Os resultados da avaliação das massas moleculares e o erro em ppm encontram-se listados na tabela 6.

Tabela 6: Valores obtidos na avaliação das massas moleculares e o erro em ppm encontrado durante a análise da proteína intacta.

Identificação	MM real**	MM encontrada	Erro (ppm)
Padrão 1_1	22125.0684	22126.4141	60.8
Padrão 1_2	22125.0684	22126.5059	65.0
Amostra 1_1	22125.0684	22125.9199	38.5
Amostra 1_2	22125.0684	22125.8184	33.9
Amostra 2_1	22125.0684	22125.7852	32.4
Amostra 2_2	22125.0684	22125.7500	30.8
Amostra 3_1	22125.0684	22125.7402	30.4
Amostra 3_2	22125.0684	22125.8926	37.3
Amostra 4_1	22125.0684	22125.8730	36.4
Amostra 4_2	22125.0684	22125.8809	36.7

*descrita na FE.

**calculada pelo software Biopharmalynx.

Fonte: Arquivo pessoal

Com o experimento realizado foi possível definir o erro máximo de massa exata, em ppm, de 65.0 para o padrão e de 38.5 nas amostras, demonstrando a exatidão na determinação inequívoca da massa do hormônio de acordo com a massa de 22125 Da preconizada na FE. Não existe um limite máximo de erro em ppm descrito na literatura para a determinação da massa molecular de proteínas, contudo quanto menor for esse valor, maior será a segurança na determinação da massa/identidade desses compostos.

O erro encontrado para as replicatas do padrão foi maior quando comparado ao erro obtido nas replicatas das amostras devido ao fato do padrão farmacopeico utilizado no experimento ter sofrido dessamidação, o que leva a uma massa molecular diferente da massa teórica (real), explicando o erro em ppm obtido.

5. CONCLUSAO

A espectrometria de massas apresenta-se como uma técnica eficaz pelo fato de possibilitar a determinação exata e inequívoca do peso molecular dos analitos, permitindo sua correta identificação. Os resultados encontrados no experimento (Tabela 7) permitiram identificar o hormônio de crescimento, estando de acordo com o valor de massa preconizado pela Farmacopeia Europeia (22125 Da). Um outro fator observado foi o tempo de retenção, estando o mesmo de acordo com o tempo preconizado na metodologia analítica para identificação do composto na FE, conforme demonstrado nos resultados.

Além disso, o erro em partes por milhão na determinação da massa molecular dos compostos calculado demonstrou a exatidão dos valores encontrados no experimento e a determinação inequívoca do peso da somatropina.

Tabela 7: Massas obtidas no experimento para as replicatas do padrão farmacopeico e amostras.

	Massa 1	Massa 2
Padrão	22126,41	22126,51
Amostra 1	22125,92	22125,82
Amostra 2	22125,79	22125,75
Amostra 3	22125,74	22125,89
Amostra 4	22125,87	22125,88

Fonte: Arquivo pessoal

6. PERSPECTIVAS

Devido da aprovação no processo de seleção para o Mestrado Acadêmico do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pretendo continuar o desenvolvimento da linha de pesquisa, com as seguintes perspectivas:

- Caracterização das formulações de homônimo de crescimento recombinante para uso humano disponíveis no mercado nacional mediante o desenvolvimento de protocolo para o mapa de peptídeos.

- Verificação da presença de alterações pós traducionais nas moléculas proteicas das formulações de homônimo de crescimento recombinante para uso humano disponíveis no mercado nacional.

- Verificação da presença de isoformas nas formulações de homônimo de crescimento recombinante para uso humano disponíveis no mercado nacional.

- Avaliação da qualidade dos produtos disponíveis no mercado nacional.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R. **Mass spectrometry of proteins and peptides in biotechnology.** Current Opinion in Biotechnology, nº 4, p 412-419, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC nº 80 de 18 de março de 2002. **Aprova o Regulamento Técnico de Registro, Alterações e Inclusão Pós-Registro e Revalidação dos produtos Biológicos, conforme documento anexo e esta Resolução.**

_____. **PREÇOS MÁXIMOS DE MEDICAMENTOS POR PRINCÍPIO ATIVO PARA COMPRAS PÚBLICAS.** Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/78fa81004707dd7d86489741cdd33a01/LISTA_CONFORMIDADE_GOV_2015-01-20_v2.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 18 de dezembro de 2014.

AIRES, M.M. **Fisiologia.** 3ª edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. 1232p.

BRADLEY C. N. et al. **Growth Hormone Molecular Heterogeneity and Exercise.** Exercise and Sport Sciences Reviews. Vol. 31, nº 4, p. 161-166, 2003.

BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de Setembro de 1976. **Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências.** Diário Oficial da União, Brasília, DF. 24 set 1976.

_____. Decreto nº 79.094 de 5 de Janeiro de 1977. **Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneamento e outros.** Diário Oficial da União, Brasília, DF. 7 jan 1977.

_____. Conselho Nacional de Secretários de Saúde. **Para entender a gestão do Programa de Medicamentos de dispensação em caráter excepcional / Conselho Nacional de Secretários de Saúde.** Brasília : CONASS, 2004. 100 p.

_____. Ministério da Saúde. **Parecer técnico-científico: O uso da Somatropina líquida administrada por caneta no tratamentoda deficiência do Hormônio do Crescimento.** Brasília-DF : Agosto, 2008.

_____. **Farmacopeia Brasileira,** volumes 1 e 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 1452p.

CANTÚ, M.D. et al. **Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático.** Química Nova, vol. 31, nº 3, p 669-675, 2008.

CHEN, W; GEBLER, J.C. **Structural Analysys of an O-Glycopeptide Derived from Recombinant Erythropoietin by SYNAPT High Definition Mass Spectrometry (HDMS)**. 720002918EN, 2009.

ELBEHRI A. **Biopharming and the Food System: Examining the Potencial Benefits and Risks**. AgBioForum, vol.8 (1), p. 18-25, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 8th edition. France: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2013.

FENSELAU, C.; VESTLING, M.M.; COTTER, R.J. **Mass spectrometric analysis of proteins**. Current Opinon in Biotechnology, vol. 4, p 14-19, 1993.

HOUDEBINE, L. M. **Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals**. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>. Acesso em 20 de julho de 2014.

LANÇAS, F.M. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finlmente “compatíveis”?**. Scientia Chomatographica, vol. 5, p 27-46, 2013.

MARINHO, A.C.M. **Avaliação e caracterização de eritropoietina humana recombinante**. 2014. 147f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 175 de 19 de junho de 1996**. Aprova o fascículo I da parte II da quarta edição da Farmacopeia-Brasileira. F.BRASIL V, 1996.

NGUYEN, D.N.; BECKER, G.W.; RIGGIN, R.M. **Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology**. Journal of Chromatography A, nº 705, p 21-45, 1995.

PORTES, E.S.; BARBOSA, E. **Condução do tratamento com hormônio de crescimento (GH) nos pacientes com diagnóstico de deficiência GH (DGH) durante o período de transição da criança para o adulto**. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia, v. 52, nº 5, 2008.

RIBELA, M.T.C.P.; GOUT, P.W.; BARTOLINI, P. **Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones**. Journal of Chromatography B, 2003.

ROCHE. Disponível em: <<http://www.roche.com.br/fmfiles/re7193008/pdf/medicamentosbiologicos1.pdf>>. Acesso em 23 de Agosto de 2014.

ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 301p.

TAICHRIB, A. et al. **High resolution TOF MS coupled to CE for the analysis isotopically resolved intact proteins.** Journal of Proteomics, vol. 74, p 958-966, 2011.

U.S. Pharmacopeia National Formulary. USP 37, NF 32. EUA: The United States Pharmacopeial Convention, 2014.

WATERS CORPORATION. **Application Solutions for Biopharmaceuticals: A Focus on Protein Therapeutics.** 720002487EN, 2012