

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

Izabel Azevedo de Lemos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NAS PREPARAÇÕES  
VACINAIS DE POLIRIBOSIL RIBITOL FOSFATO (PRP)**

Rio de Janeiro  
2016

Izabel Azevedo de Lemos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NAS PREPARAÇÕES  
VACINAIS DE POLIRIBOSIL RIBITOL FOSFATO (PRP)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dra. Bernardete Ferraz Spisso  
Dr. José Godinho da Silva Junior

Rio de Janeiro  
2016

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

Lemos, Izabel Azevedo

Avaliação de métodos espectrofotométricos para a determinação do teor de proteínas residuais nas preparações vacinais de polirribosil ribitol fosfato (PRP) /  
Izabel Azevedo Lemos – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

111 f.: il.

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

Orientadores: Bernardete Ferraz Spisso e José Godinho da Silva Junior

1. Polissacarídeos Bacterianos. 2. Haemophilus influenzae tipo b . 3. Vacinas  
Anti-Haemophilus. 4. Espectrofotometria. 5. Avaliação. 6. Métodos Analíticos de  
Preparação de Amostras. 7. Controle de Qualidade I. Título

Evaluation of spectrophotometric methods for determining the content of residual  
proteins in preparations vaccine of polirribosil ribitol phosphate (PRP)

Izabel Azevedo de Lemos

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A  
DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NAS PREPARAÇÕES  
VACINAIS DE POLIRIBOSIL RIBITOL FOSFATO (PRP)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 28/04/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Monica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (Doutora)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Hilton Jorge Nascimento (Doutor)  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

---

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

José Godinho da Silva Junior (Doutor) - Orientador  
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

A Deus, aos meus filhos e neta,  
Camila, Carolina, Jeferson e Sophie.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela inspiração, força e alegria, em tudo na minha vida.

A Bio-Manguinhos pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dra. Bernadete Ferraz Spisso, pela excelente orientação, generosidade, atenção e esforço para superação de todos os desafios na realização deste trabalho em todas as suas etapas.

Ao Dr. José Godinho da Silva Júnior pela sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos, sabedoria e experiência, cujas contribuições foram de valor inestimável para o sucesso desta empreitada.

Aos professores Dra. Mônica Ferreira, Dra. Marcia Regina, Dra. Silvana Jacob, Dra. Katia Leandro, Dr. André Gemal, Dra. Sílvia e Dra. Alícia pelo incentivo e colaboração.

À Ana Lucia Palmigiani pelo incentivo e confiança.

À Tânia Pato, pela sua inestimável colaboração e generosidade em ceder prontamente todas as amostras necessárias para todos os experimentos.

Aos colegas do Departamento de Vacinas Bacterianas Debora Elias, Érica e Daniel, pela generosa contribuição, amizade e confiança.

À Renata, Hilton e colegas do Laboratório de macromoléculas pela generosa contribuição com os seus conhecimentos e materiais cedidos para a realização deste trabalho.

Aos colegas Gisele, Ana Claudia, Cláudia, Camila, Gabriel, Carol, Ana Paula, Simone, Marta e Lauro pela cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Lucia, Samuel e colegas do setor de lavagem de esterilização pela amizade e zelo com os materiais utilizados no desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus filhos Camila, Carolina e Jeferson pelo amor incondicional, compreensão e colaboração em tudo e em todos os momentos.

À Sophie minha neta querida, fonte de alegria e inspiração.

À minha mãezinha e ao meu querido pai por interceder por mim em suas orações cotidianas.

Às funcionárias da Secretaria Acadêmica Sâmela, Gisele, Jéssica e Gorette, pela simpatia e presteza no dia-a-dia dos alunos.

Posso pela minha parte assegurar com toda a segurança que a negação da fé carece de toda a base científica. A meu ver jamais se encontrará uma verdadeira contradição entre a fé e a ciência.

Millikan (Prêmio Nobel de Física, 1923)

## RESUMO

Pneumonia grave e meningite são doenças provocadas pela bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) que podem ser prevenidas por vacinas feitas a partir do polissacarídeo capsular de Hib (polirribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP). Na purificação do PRP, os principais contaminantes (ácidos nucleicos, proteínas e endotoxinas) são removidos seletivamente obtendo-se um produto de alta imunogenicidade. O clássico método de Lowry tem sido utilizado para quantificação de proteínas no PRP, porém tem demonstrado ser inadequado para o baixíssimo nível de impurezas encontrado. Este trabalho buscou um método mais sensível e foi aplicado a três lotes experimentais de PRP de Bio-Manguinhos/Fiocruz, comparando-se ao método de Lowry, os métodos espectrofotométricos Peterson e Smith no intervalo de 2,5 a 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos indicaram a superioridade do método de Peterson, com sensibilidade de  $0,0096 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , precisão com CV% de 5,0 a 6,9%, acurácia de 97%, limites de detecção de  $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e limite de quantificação de  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Pelo método Lowry foi obtida sensibilidade de  $0,0039 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o CV% na quantificação foi 3,8% enquanto com o método de Smith obteve-se CV% de 18 a 48% e sensibilidade de  $0,0026 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , não obstante, devido à necessidade de incubação a  $60^{\circ}\text{C}$ , este último demonstrou ser inadequado para quantificação das amostras de PRP que não são estáveis a esta temperatura. Além das vantagens citadas, o método de Peterson contribuiu na redução de resíduos químicos e na redução do tempo de análise.

Palavras-chave: Polissacarídeo de *Haemophilus Influenzae* tipo b. Vacina Hib. Quantificação de proteínas. Método Espectrofotométrico. Método de Peterson. Método de Folin-Lowry. Método de Smith.

## ABSTRACT

Severe pneumonia and meningitis are diseases caused by the bacterium *Haemophilus influenzae* type b (Hib) that can be prevented by vaccines made from the capsular polysaccharide of Hib (polyribosyl ribitol phosphate; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-phosphate; PRP). In the purification of PRP, the major contaminants (nucleic acids, proteins and endotoxins) are selectively removed obtaining a product of high immunogenicity. The classic Lowry method has been used to quantify the protein in PRP, but has been shown to be inadequate for the very low level of impurities found. This work sought a more sensitive method and was applied to three experimental lots of PRP produced at Bio-Manguinhos/Fiocruz. Comparing to the Lowry method, the spectrophotometric methods Peterson and Smith in the range of 2.5 to 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , the results indicated the superiority of the Peterson method, with sensitivity of 0.0096  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , precision with CV% of 5.0 to 6.9%, accuracy of 97%, detection limits of 0.1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and the quantification limit of 0.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . By the Lowry method, was obtained sensitivity of 0.0039  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and the CV% in the quantification was of 22.5 to 33.8%, whereas by the Smith method was obtained CV% of 18 to 48% and sensitivity of 0.0026  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , nevertheless due to the need for incubation at 60 °C it was found to be inadequate for protein quantification of the PRP samples that are not stable at this temperature. The Peterson method also provided underlying benefits in increased solubility and reduced analysis time.

Keywords: Polysaccharide *Haemophilus influenzae* type b. Hib vaccine. Quantification of protein. Spectrophotometric method. Peterson method. Folin-Lowry method. Smith method.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Calendário nacional de vacinação.....	27
Figura 2	Fórmula estrutural do PRP.....	30
Figura 3	Processo de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) .....	31
Figura 4	Parâmetros avaliados para substituição do método de quantificação de proteína residual do PRP.....	35
Figura 5	Ilustração esquemática da redução do íon $\text{Cu}^{2+}$ pela proteína em meio alcalino (Reação do biureto) .....	36
Figura 6	Mecanismo da reação do método Lowry.....	37
Figura 7	Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio (SDS) .....	37
Figura 8	Mecanismo da reação do método Peterson (1983).....	38
Figura 9	Conc. de proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ) x Absorvância (750nm). Curvas obtidas com o método Peterson (1983) usando albumina de soro bovino (BSA) e gama globulina bovina (BGG).....	38
Figura 10	Mecanismo da reação do método Smith et al (1985) .....	40
Figura 11	Reação esquemática do ácido bicinconínico com íon $\text{Cu}^{+}$ .....	40
Figura 12	Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) x Absorvância (562nm). Curvas obtidas com o método de Smith et al. (1987) usando albumina de soro bovino (BSA) e gama globulina bovina (BGG) .....	41
Figura 13	Estrutura do corante azul de Comassie brilhante G-250 (Formula molecular $\text{C}_{47}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$ ) .....	42
Figura 14	Representação esquemática do método Bradford.....	43
Figura 15	Onda plano polarizada .....	44
Figura 16	O espectro da radiação eletromagnética e a energia dos fótons no intervalo visível do espectro .....	46
Figura 17	Diagrama esquemático de um experimento espectrofotométrico de feixe simples .....	46
Figura 18	Absortividade molar: Absorção de luz em virtude da estrutura química das proteínas e das ligações peptídicas.....	48
Figura 19	Gráfico: Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) x Eluição $K_D$ 0,45. Estabilidade do PRP após 6 m. de incubação em diferentes temperaturas .....	49

Figura 20	Gráfico: Temperatura (°C) x Conteúdo de PRP (%). Conteúdo de PRP após 12 m. de incubação em diferentes temperaturas .....	49
Figura 21	Fluxograma do método Lowry.....	60
Figura 22	Fluxograma do método de Peterson.....	62
Figura 23	Fluxograma do método de Smith.....	63
Figura 24	Método Lowry, com volume final de 1300 µL. Variação dos solventes água ultrapura tipo 1 (◇); hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> (◆) .....	71
Figura 25	Método Peterson, com volume final de 500 µL. Variação dos solventes e dias dos ensaios: água ultrapura tipo 1 (●); hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> , no dia 2 (○) .....	71
Figura 26	Método Smith. Variação dos solventes: hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> , 60°C/15 min. (■); água ultrapura tipo 1 60°C / 15 min. (○) .....	72
Figura 27	Método de Smith (60°C /30 min). Variação dos solventes,,: hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> no dia 1 (●); hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> contendo 2% de SDS, no dia 2 (x) .....	73
Figura 28	Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 2, para o método Lowry .....	77
Figura 29	Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 5, para o método Lowry com alteração do intervalo de concentrações para 2,5 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> e alíquotas de 400µL .....	79
Figura 30	Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 7, para o método de Peterson .....	81
Figura 31	Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 13, para o método Smith .....	84
Figura 32	Relação concentração de BSA (Conc. BSA, µg/mL) x resposta (Abs) dos métodos Lowry (●), Peterson (▲) e Smith* (■) em solvente água ultrapura tipo 1. (*) incubação a 60°C / 15 min .....	86
Figura 33	Relação concentração de BSA (µg.mL <sup>-1</sup> ) x resposta (Abs) dos métodos Lowry (●), Peterson (▲) e Smith* (■), em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> e incubação a 60°C / 15 min) .....	87
Figura 34	Método Lowry, com volume final de 1300 µL, em solvente água ultrapura tipo 1. Variação dos dias dos ensaios: dia 1 (-); dia 2 (●) .....	88
Figura 35	Método Lowry com volume final de 1300 µL, em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> . Variação dos dias dos ensaios: dia 1 (○); dia 2 (◆) .....	89

Figura 36	Método Lowry em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> . Variação dos volumes finais e dias dos ensaios: 1300 µL (○), no dia 1; 2600 µL (■), no dia 2 .....	89
Figura 37	Método Peterson em solvente água ultrapura tipo 1. Variação dos volumes finais e dias dos ensaios: 500 µL, no dia 1 (●); 1000 µL, no dia 2 (◇) .....	90
Figura 38	Método Smith em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> . Variação do tempo de incubação. Curva de calibração no intervalo de 2,5 a 15 µg/mL: 60 °C/15 min. (▲); 60°C/30min. (-) .....	91
Figura 39	Método Smith em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L <sup>-1</sup> . Variação do tempo de incubação. Curva de calibração no intervalo de 5 a 30 µg.mL <sup>-1</sup> : 60°C/15 min. (■); 60°C /30 min. (●) .....	92
Figura 40	Comparação das curvas em solvente e na matriz PRP Lote 1, pelo método Peterson (1 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> BSA) .....	95
Figura 41	Comparação das curvas em solvente e na matriz PRP Lote 2, pelo método Peterson (1-15µg.mL <sup>-1</sup> BSA) .....	95
Figura 42	Comparação das curvas em solvente e na matriz PRP Lote 3, pelo método Peterson (1 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> BSA) .....	96
Figura 43	Gráfico de resíduos: Método Lowry em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de 2,5 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> (0,025 a 0,15 LME) .....	98
Figura 44	Gráfico de resíduos: Método Peterson em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de 2,5 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> (0,025 a 0,15 LME) .....	99
Figura 45	Gráfico de resíduos - Método Peterson em solvente água utrapura tipo 1 no intervalo de 1 a 15 µg.mL <sup>-1</sup> (0,010 a 0,15 LME) .....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Curva de calibração de BSA em solvente, do método Lowry, no intervalo de 0,025 a 0,50 LME, metodologia usada em Bio-Manguinhos ..... 75
Tabela 2	Dados obtidos para o método Lowry pela metodologia usada em Bio-Manguinhos. Cálculo da curva de calibração por regressão linear simples .....76
Tabela 3	Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Lowry pela metodologia usada em Bio-Manguinhos (atual) ..... 77
Tabela 4	Curva de calibração de BSA em solvente, dos métodos de Lowry e de Peterson (0,025 a 0,15 LME) .....78
Tabela 5	Dados obtidos para o método de Lowry com alteração do intervalo de concentração para 2,5 a 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples ..... 78
Tabela 6	Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Lowry com modificação do intervalo de concentração para 2,5-15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ..... 79
Tabela 7	Dados obtidos para o método Peterson, com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples ..... 80
Tabela 8	Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Peterson .....82
Tabela 9	Curva de calibração de BSA em solvente, do método Smith (0,05 a 0,3 LME) .....82
Tabela 10	Curva de calibração de BSA em solvente, do método Smith (0,025 a 0,15 LME) ..... 83
Tabela 11	Dados obtidos para o método Smith, com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples..... 83
Tabela 12	Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Smith, incubação a 60°C/15 min) ..... 84
Tabela 13	Quantidade de BSA esperada no menor nível de concentração para os métodos Lowry, Peterson e Smith ..... 85
Tabela 14	Preparo da curva de calibração de BSA em solvente água ultrapura tipo 1 ou matriz PRP para o método método Peterson* (0,01 a 0,15 LME) ..... 93
Tabela 15	Método Peterson: Avaliação da seletividade e do efeito matriz ..... 94
Tabela 16	Teores de proteína residual em termos percentuais nas amostras de PRP ..... 94

Tabela 17	Resultados obtidos da comparação entre as curvas do método de Peterson (0,01 a 0,15 LME) em solvente (água ultrapura tipo 1) e em matriz (Solução de PRP em água ultrapura tipo 1) .....	96
Tabela 18	Dados das equações da reta nos intervalos estudados .....	100
Tabela 19	Repetibilidade para os métodos Peterson e Lowry .....	101
Tabela 20	Recuperação do analito (BSA a $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pelo método Peterson (0,01 a 0,15 LME) e pelo método Lowry (0,025 a 0,15 LME) .....	102
Tabela 21	Limite de detecção e de quantificação dos métodos de Peterson e de Lowry nos intervalos estudados .....	103
Tabela 22	Umidade residual das amostras de PRP .....	104
Tabela 23	Recuperação do analito (BSA a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pelo método de Peterson (0,01 a 0,15LME) .....	105

## SUMÁRIO

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	25
1.2 O DESENVOLVIMENTO E A PRODUÇÃO DE VACINAS NO BRASIL .....	28
1.3 <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i> TIPO b E A PRODUÇÃO DE VACINAS .....	29
1.4 CONTROLE DE QUALIDADE DAS VACINAS CONJUGADAS CONTRA Hib.....	32
1.5 DESVANTAGENS DO MÉTODO USADO PARA O CONTROLE DE PROTEÍNAS RESIDUAIS EM PRP.....	32
1.6 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	33
1.6.1 Seleção dos métodos analíticos.....	34
1.6.1.1 <i>O método Lowry</i> .....	35
1.6.1.2 <i>O método Peterson</i> .....	37
1.6.1.3 <i>O método Smith</i> .....	39
1.6.1.4 <i>Método Bradford</i> .....	41
1.6.1.5 <i>Método absorção no ultravioleta (UV)</i> .....	43
1.6.1.6 <i>Método biureto</i> .....	43
1.7 FUNDAMENTOS BÁSICOS DA ESPECTROFOTOMETRIA .....	44
1.8 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
1.9 AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE VACINAS, BIOFÁRMACOS E REATIVOS PRODUZIDOS EM BIO- MANGUINHOS .....	50
1.9.1 Seletividade e efeito matriz.....	51
1.9.2 Intervalo de medição e intervalo linear.....	51
1.9.3 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade.....	52
1.9.4 Limite de detecção (LD) .....	52
1.9.5 Limite de quantificação (LQ) .....	52
1.9.6 Exatidão (recuperação) .....	53
1.9.7 Precisão .....	53
<b>2 OBJETIVO</b>	
2.1 OBJETIVO GERAL .....	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54

### 3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS.....	55
3.1.1 Padrões.....	55
3.1.2 Reagentes e solventes.....	55
3.1.3 Equipamentos e acessórios.....	56
3.1.4 Amostras.....	57
3.2 PROCEDIMENTOS .....	57
3.2.1 Soluções padrão.....	57
3.2.1.1 <i>Solução padrão estoque</i> .....	57
3.2.1.2 <i>Solução padrão de trabalho a 50 µg.mL<sup>-1</sup> em solvente ou matriz</i> .....	57
3.2.1.3 <i>Solução padrão de trabalho a 10 µg.mL<sup>-1</sup> em solvente ou matriz</i> .....	57
3.2.1.4 <i>Solução padrão de trabalho a 5 µg.mL<sup>-1</sup> em solvente ou matriz</i> .....	57
3.2.2 Preparo das amostras.....	58
3.2.2.1 <i>Amostras brancas de reagentes</i> .....	58
3.2.2.2 <i>Amostras brancas de PRP</i> .....	58
3.2.2.3 <i>Amostras de PRP fortificadas</i> .....	59
3.2.3 Diferentes métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas residuais em polissacarídeos de poliribosil ribitol fosfato.....	59
3.2.3.1 <i>Método Lowry</i> .....	59
3.2.3.2 <i>Método Peterson (Método Lowry modificado)</i> .....	61
3.2.3.3 <i>Método Smith</i> .....	62
3.2.4 Avaliação da aplicabilidade do método proposto como substituto ao método vigente em Bio-Manguinhos para a determinação de proteínas residuais em polissacarídeos de PRP .....	
3.2.5 Avaliação da adequabilidade do método analítico selecionado .....	64
3.2.5.1 <i>Intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental)</i> .....	64
3.2.5.2 <i>Seletividade</i> .....	65
3.2.5.3 <i>Efeito matriz</i> .....	65
3.2.5.4 <i>Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade</i> .....	65
3.2.5.5 <i>Precisão (Repetibilidade)</i> .....	66
3.2.5.6 <i>Limite de detecção (LD)</i> .....	66
3.2.5.7 <i>Limite de quantificação (LQ)</i> .....	67
3.2.5.8 <i>Exatidão (Recuperação)</i> .....	67
3.2.6 Aplicação do método analítico selecionado para a análise de amostras de PRP.....	67
3.2.6.1 Preparo das amostras.....	67
3.2.6.2 <i>Preparo da curva de calibração</i> .....	67

3.2.6.3 <i>Quantificação</i> .....	67
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 ESTUDO DE SOLUBILIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	69
4.2 ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS USADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NO PRODUTO VACINAL PRP (POLIRIBOSIL RIBITOL FOSFATO) .....	74
4.2.1 Método Lowry .....	75
4.2.2 Método Peterson (Lowry modificado) .....	80
4.2.3 Método Smith .....	82
4.2.4 Sensibilidade inter-métodos .....	85
4.2.5 Sensibilidade intra-métodos .....	87
4.2.5.1 <i>Método Lowry</i> .....	88
4.2.5.2 <i>Método Peterson (Lowry modificado)</i> .....	90
4.2.5.3 <i>Método Smith</i> .....	90
4.2.6 Comparação dos métodos Lowry e Peterson .....	92
4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	92
4.3.1 Seletividade e efeito matriz.....	92
4.3.2 Intervalo de medição e intervalo linear (função da calibração) .....	97
4.3.3 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade.....	99
4.3.4 Precisão (Repetibilidade) .....	100
4.3.5 Exatidão (recuperação) .....	102
4.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação.....	102
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PRP.....	104
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	106
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	107
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Os níveis de saúde expressam a organização social e econômica do país e a saúde da população depende principalmente das condições de moradia, saneamento básico, alimentação, meio ambiente, trabalho, renda, educação, atividade física, transporte, lazer e acesso aos bens e serviços essenciais (BRASIL, 2013a).

Pneumonia grave e meningite são doenças provocadas pela bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) que podem ser prevenidas por vacinas feitas a partir do polissacarídeo capsular de Hib (poliribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP). Apesar de doenças meningocócicas ocorrerem no mundo inteiro, em países com recursos limitados, a vacinação é a principal estratégia de atuação do Estado, por ser a alternativa mais eficaz e acessível para prevenção (WHO, 2014).

Visto que as políticas de acesso a bens e serviços essenciais, preconizadas pela lei 8.080 (1990), tais como educação, transportes, moradia e lazer tem sido precários para a maioria dos cidadãos brasileiros, pode-se inferir que ausentes estas condições que expressam os níveis de saúde, aumentam as probabilidades de adoecimento da população e assim, o atendimento adequado à todos torna-se mais difícil e oneroso para o Serviço Único de Saúde (SUS), neste sentido, o Estado enfatiza ações de produção e distribuição de vacinas à população (BRASIL, 2013a).

Neste contexto, compatibilizar pragmatismo com utopia, realismo prático com capacidade de sonhar, é tão desafiador para os profissionais da saúde pública no Brasil, quanto atender ao princípio da integralidade preconizado pelo SUS uma vez que a comunidade científica, tecnológica e política, na abordagem dos processos de adoecimento e de seu enfrentamento quase sempre se distanciam das necessidades e dos saberes práticos da sociedade (AYRES, 2008).

Segundo Costa (2009), na área de Vigilância Sanitária, buscar fatores de risco de uma doença caracterizam ações estratégicas de prevenção em saúde para reduzir ou eliminar novas ocorrências no coletivo. Com a globalização os desafios são evidenciados (SANTOS, 1998, p. 18), para contorná-los o Estado adota medidas de prevenção e controle das doenças através das ações de vigilância sanitária e epidemiológica relacionados à produção, controle e fiscalização de serviços e produtos para a saúde e no incremento do desenvolvimento científico e tecnológico (BRASIL, 1999).

Tratando-se especificamente de vacinas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a priorização da garantia da qualidade na produção e desenvolvimento de produtos eficazes e seguros pois são medicamentos direcionados aos indivíduos saudáveis visando a prevenção de doenças (WHO, 2006). Segundo a WHO (2014), a vacinação é uma alternativa eficaz e acessível para prevenção de doenças como a pneumonia grave e meningite provocadas pela bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). De fato, ocorreu uma diminuição dos casos de meningites bacterianas e de outras enfermidades como pneumonia, otite e sinusite em diversos países. No Brasil, registrou-se em 1999 uma redução superior a 90% no número de casos, incidência e óbitos após a primeira imunização contra meningite tipo b (BRASIL, 2012a).

A eficácia e segurança das vacinas deve ser confirmada pelos fabricantes e pelos Laboratórios que compõe a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária antes do fornecimento (BRASIL, 2004). A fiscalização dos locais de fabricação e o controle de produtos são realizadas por todos os laboratórios que compõem a Rede Oficial de Laboratórios de Controle de Qualidade em Saúde (BRASIL, 2009a).

No escopo de suas atribuições, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ressalta a importância da qualidade analítica dos resultados como um dos instrumentos fundamentais para a proteção e promoção da saúde da população e exige que os medicamentos sejam produzidos conforme as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos para uso humano (BPF), segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). As inspeções sanitárias, visam assegurar que os medicamentos fabricados sejam adequados aos fins a que se destinam, cumpram com os requisitos estabelecidos em seu registro e não coloquem os pacientes em risco (BRASIL, 2013b).

O SUS disponibiliza à população brasileira as vacinas (Figura 1), contra as meningites por *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib).

Segundo Josefsberg e Buckland (2012), requisitos regulamentares rigorosos são muitas vezes a base para estabelecer um paradigma de purificação, sendo assim, métodos analíticos exequíveis e confiáveis são essenciais para validar cada etapa, já que eventuais mudanças no processo de produção podem ter um impacto significativo na qualidade do produto final. Para atingir o nível de qualidade adequado, métodos analíticos mais sensíveis e precisos são fundamentais para otimizar o rendimento dos produtos e a qualidade do produto final (BRASIL, 2005).

Figura 1 - Calendário nacional de vacinação.

CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO															
Grupo Alvo	Idade	BCG	Hepatite B	Pentax/DTP	VIP/VOP	Pneumocócica 10V (conjugada)	Rotavírus Humano	Menigocócica C (conjugada)	Febre Amarela	Hepatite A	Triplice Viral	Tetra Viral*	HPV	Dupla Adulto	dTpa**
Crianças	Ao nascer	Dose única	Dose ao nascer												
	2 meses			1ª dose	1ª dose (com VIP)	1ª dose	1ª dose								
	3 meses							1ª dose							
	4 meses			2ª dose	2ª dose (com VIP)	2ª dose	2ª dose								
	5 meses							2ª dose							
	6 meses			3ª dose	3ª dose (com VIP)										
	9 meses								Uma dose						
	12 meses					Reforço		Reforço			1ª dose				
	15 meses			1ª reforço (com DTP)	1ª reforço (com VOP)					Uma dose		Uma dose			
Adolescente	4 anos			2ª reforço (com DTP)	2ª reforço (com VOP)				Reforço						
	9 anos														
Adulto	10 a 19 anos		3 doses (a depender da situação vacinal)						Uma dose e um reforço, a depender da situação vacinal		2 doses		2 doses (9 a 13 anos)	Reforço a cada (10 anos)	
	20 a 59 anos		3 doses (a depender da situação vacinal)						Uma dose e um reforço, a depender da situação vacinal		1 dose (até 49 anos)			Reforço a cada (10 anos)	
Idoso	60 anos ou mais		3 doses (a depender da situação vacinal)						Uma dose e um reforço, a depender da situação vacinal					Reforço a cada (10 anos)	
Gestante															
															3 doses (a depender da situação vacinal)

\*A vacina tetra viral (corresponde a segunda dose da triplice viral e a dose da vacina varicela.  
 \*\* A vacina dTpa também será oferecida para profissionais de saúde que atuam em maternidade e em unidade de internação neonatal (UNI/UCI) convencional e UCI (canguinuí) atendendo recém-nascidos e crianças menores de 1 ano de idade.  
 Para informações adicionais recomenda-se consultar a Instrução Normativa do Calendário Nacional de Vacinação disponível no seguinte endereço: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)

Fonte: (BRASIL, 2009b)

No sentido de melhorar a qualidade do método de quantificação de proteínas do PRP, a seleção do método foi iniciada com uma avaliação teórica preliminar dos métodos

espectrofotométricos elegíveis (UV, biureto, Peterson, Smith e Bradford) e a partir daí foram identificados os mais adequados à fase experimental de comparação com o método clássico de Lowry. Na fase teórica os cinco métodos citados foram avaliados quanto à especificidade, variabilidade entre proteínas diferentes, a sensibilidade relativa à albumina de soro bovino, o tempo de análise e o custo. Também foi avaliada a quantidade de amostra requerida e dos resíduos químicos gerados pela análise, a fim de contribuir com a redução de resíduos em Bio-Manguinhos proposta por Pereira (2016).

## 1.2 O DESENVOLVIMENTO E A PRODUÇÃO DE VACINAS NO BRASIL

Em 2004 completou um século a primeira campanha de vacinação em massa feita no Brasil. A campanha foi idealizada por Oswaldo Cruz, ao retornar ao país, em 1899 após realizar especialização em bacteriologia no Instituto Pasteur de Paris. A campanha tinha por objetivo controlar a varíola, uma doença que dizimava boa parte da população do Rio de Janeiro. Atualmente, poderia se pensar que a introdução da vacina teria sido um objetivo facilmente exequível, mas pelo contrário, devido à oposição popular resultou na chamada Revolta da Vacina (BRASIL, 2003b).

Segundo Löwy (2006), a campanha sanitária entre 1903 e 1907, conduzida por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro pertence à categoria de símbolo. Esta campanha concentrou-se em três doenças, a peste, a febre amarela e a varíola. Seu sucesso deve-se em grande parte ao presidente Rodrigues Alves, eleito em 1902 que tinha o objetivo de livrar a capital das doenças epidêmicas. Seu êxito, foi descrito como “a vitória das forças das luzes, da ciência e da razão”.

Para eliminar a varíola, Cruz tentou fazer uma campanha intensiva de vacinação e a erradicação das duas outras infecções, passou pelo controle de seus vetores e isolamento dos doentes. As campanhas de destruição dos ratos e de limpeza das ruas foram em geral, bem aceitas pelos habitantes do Rio de Janeiro, mas a vacinação obrigatória encontrou forte resistência dos meios populares, dos intelectuais, da igreja e da imprensa, por considerarem a restrição das liberdades individuais algo inaceitável. Além do mais, achavam que os poderes públicos, sob pretexto de proteger toda a população, na realidade protegiam apenas os interesses das camadas privilegiadas, pois as medidas sanitárias, apresentavam contraste (pouco visível nos documentos de época), entre as atividades de combate ao mosquito nos bairros modestos e as de alto custo, conduzidas nos bairros nobres. Apesar da oposição

popular, seu trabalho de saneamento no Rio de Janeiro obteve o sucesso inquestionável e foi reconhecido internacionalmente (LÖWY, 2006).

Passaram-se décadas, até a criação do Programa Nacional de Imunizações (PNI), implantado 1975 com a realização da campanha nacional de vacinação contra meningite meningocócica. Em 1981, decorrente do aumento considerável no consumo de vacinas e da sua falta no mercado externo foi criado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos, porém no início dos anos 1980 algumas vacinas brasileiras não estavam sendo produzidas dentro dos padrões de qualidade adequados até que se investiu na modernização de instalações e equipamentos e na construção de novas unidades produtoras entre as quais Bio-Manguinhos, que iniciou com sucesso a produção e o fornecimento da vacina monovalente contra *Haemophilus influenzae* tipo b, em 1999 e da vacina conjugada tetravalente (DTP + Hib), em 2002 (BRASIL, 2003b).

### 1.3 HAEMOPHILUS INFLUENZAE TIPO b E A PRODUÇÃO DE VACINAS

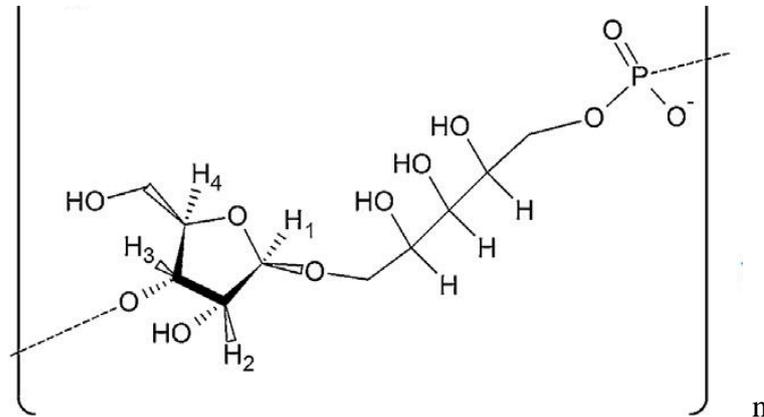
*Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é uma bactéria que ocorre no mundo inteiro, responsável por doenças graves como pneumonia, meningite e infecções inflamatórias graves. Estima-se que tenha provocado dois a três milhões de casos e 386.000 óbitos no ano 2000. A introdução de vacinas conjugadas contra Hib resultou em uma significativa redução na infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b em crianças de até cinco anos no mundo inteiro. Em vista da sua segurança e eficácia, a OMS recomenda que estas vacinas sejam incluídas em todos os programas de imunização infantis de rotina. Dados recentes indicam que 95% dos Estados Membros da OMS já incluíram estas vacinas em seus programas de imunização e outros planejam incluí-la (WHO, 2014).

As vacinas conjugadas—contra Hib são produzidas a partir de uma cepa de polissacarídeo capsular de Hib do tipo b, um polímero linear composto de unidades de (poliribosil ribitol fosfato; 5-D-ribitol-(1→1)-β-D-ribose-3-fosfato; PRP) ligado covalentemente a uma proteína transportadora não tóxica (WHO, 2000).

A estrutura do polissacarídeo de *Haemophilus Influenzae* tipo b, o PRP (figura 2), foi inicialmente descrita por Zamenhof et al (1953 apud CRISEL et al, 1975) e outros autores como um polímero constituído apenas de ribose e fosfato, mas não explicavam sua massa total. A partir dos estudos de Schneerson et al e Argaman et al (1972 apud CRISEL et al, 1975) que descreveram os polímeros contendo ribose e ribitol, Crisel et al (1975),

conseguiram elucidar a estrutura do PRP, determinar as proporções de ribose, ribitol e fosfato e explicar o caráter não redutor do PRP, apesar da presença de ribose.

Figura 2 - Fórmula estrutural do PRP



Fonte: (MARTINEAU et al, 2015).

O processo produtivo de vacinas contra Hib é complexo e envolve várias etapas, iniciando-se com a produção do PRP, e conforme descrito nas patentes industriais de *Smithkline Beecham Biologicals S. A.* (1999), *American Cyanamid Company* (1980), Uclaf e Brossard et al (1980) ou de outras semelhantes.

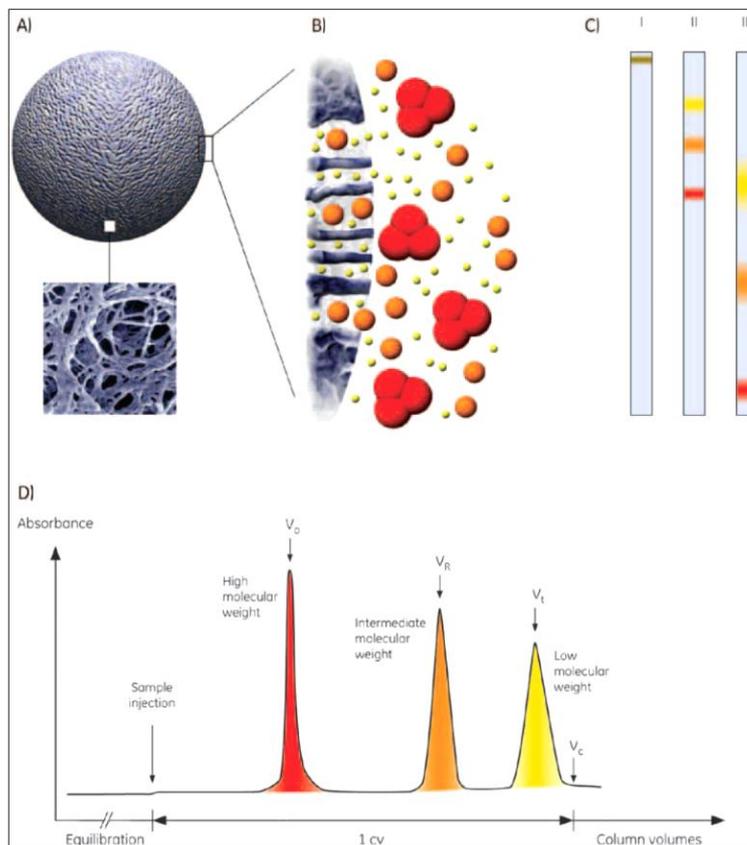
Na preparação do PRP, cujo principal objetivo é a remoção das proteínas, a cromatografia líquida é uma das estratégias analíticas para eliminar estas e outras impurezas dos polissacarídeos de Hib. A filtração em gel ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) permite controlar automaticamente o fluxo e monitorar o progresso da purificação através dos detectores (absorvância UV/Vis, condutividade, pH) no processo de separação e coletar automaticamente as frações (UCLAF; BROSSARD et al, 1980).

A cromatografia por filtração em gel, separa moléculas que diferem quanto ao tamanho e forma, como é o caso das proteínas, cujo peso molecular pode variar de alguns milhares a milhões. A fase móvel, via de regra, é aquosa e a matriz é um gel constituído de esferas com poros de tamanhos definidos. As moléculas menores que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, enquanto as maiores são excluídas; assim, as moléculas menores percorrem ao longo de uma coluna um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão em primeiro lugar. A amostra é introduzida em uma coluna, preenchida com um gel ou

um material particulado poroso, sendo eluída pela fase móvel através da coluna, e a separação é feita por diversas trocas entre o soluto e o solvente da fase móvel com os poros do material de empacotamento cujo tamanho determina a faixa de peso molecular da separação (SILVA JÚNIOR, 2001).

A figura 3, mostra esquematicamente a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) ou filtração em gel.

Figura 3 - Processo de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). (A) Desenho esquemático de uma partícula aumentada (microscopia Eletrônica); (B) Desenho esquemático da amostra eluindo dentro dos poros; (C) Descrição gráfica da separação; (D) Cromatograma..



Fonte: (AKTA Purifier GE, 2014).

Nas etapas seguintes da produção das vacinas conjugadas de Hib, o polissacarídeo purificado, derivado de uma cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b, é ligado covalentemente a uma proteína transportadora, como por exemplo toxóide tetânico. A proteína transportadora, quando conjugada ao PRP, é capaz de induzir uma resposta imune ao polissacarídeo. As vacinas contra Hib estão disponíveis na apresentação monovalente, tetravalente e pentavalente (combinada com as vacinas contra difteria, tétano e pertussis (DTP), com ou sem a

poliomielite injetável (IPV) e hepatite B), podendo também ser combinada com a vacina conjugada meningocócica C (FARMACOPEIA Européia, 2011).

#### 1.4 CONTROLE DE QUALIDADE DAS VACINAS CONJUGADAS CONTRA Hib

O fornecimento de vacinas depende da confirmação da eficácia e segurança por meio de testes de controle de qualidade pelos fabricantes e pelos Laboratórios de Controle que compõe a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária. As ações para garantir a qualidade dos produtos de interesse para a saúde englobam a fiscalização dos locais de fabricação, o controle de produtos relativos à saúde e a coordenação das ações de vigilância sanitária realizadas por todos os laboratórios que compõem a rede oficial de Laboratórios de Controle de Qualidade em Saúde (BRASIL, 2004).

O controle de qualidade das vacinas conjugadas Hib atualmente depende quase inteiramente dos métodos físico-químicos para monitorar a qualidade durante a produção dos lotes ao longo do tempo. Cada lote de polissacarídeo deve ser testado para assegurar sua pureza e os limites devem ser expressos em relação à massa de polissacarídeo corrigida pelo teor de umidade. Cada produtor deve definir os limites de impurezas para os seus produtos conforme as normas vigentes pelas autoridades nacionais (WHO, 2000).

Segundo a WHO (2014), a maioria dos ensaios para liberação dos lotes das vacinas conjugadas de *H. Influenzae* tipo b enfatizam a pureza e a caracterização molecular para garantir a consistência da composição dos lotes com a especificação das vacinas usadas em testes clínicos. Os testes de rotina do controle de qualidade são baseados em critérios físico-químicos para monitoramento da consistência e qualidade dos polissacarídeos, da proteína carreadora e dos *bulks* conjugados. Um dos parâmetros determinantes da qualidade do PRP é o teor de proteínas residuais, outros parâmetros avaliados são o conteúdo de ribose, fósforo, ácido nucleico, a quantificação de endotoxinas bacterianas e a distribuição de peso molecular.

O conteúdo de proteína nos polissacarídeos purificados de Hib deve ser menor que 1%, calculado em relação à massa seca da substância, utilizando-se albumina de soro bovino como referência (FARMACOPEIA Europeia, 2011),

#### 1.5 DESVANTAGENS DO MÉTODO UTILIZADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PRP

O método Lowry et al (1951) é sem dúvida o mais popular para a determinação de proteínas totais. Citado em inúmeros trabalhos publicados em diversas áreas de conhecimento, tais como biotecnologia, biologia, bioquímica e biomédica, mas a despeito de sua popularidade e simplicidade, encontrou-se inúmeras propostas de alterações e alternativas a fim de melhorar a qualidade dos ensaios de quantificação de proteínas na rotina dos laboratórios de controle de qualidade destacando-se o método de Peterson (método Lowry modificado), o método Smith, (ácido bicinconínico ou BCA) e o método Bradford (corante azul de Comassie ou CBBG), (PETERSON, 1983; SMITH et al, 1985; BRADFORD, 1976).

O Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, obedecendo às recomendações internacionais (FARMACOPEIA Europeia, 2011; WHO, 2000), utiliza para rotina de quantificação de proteínas das amostras de PRP, o método de Lowry et al (1951).

No entanto, observou-se a necessidade da análise crítica da revisão da metodologia de quantificação proteica, estudo do processo produtivo para identificação de possíveis interferentes, uso de estratégias analíticas ou emprego de outro método quantitativo que possa oferecer melhores resultados que o método clássico de Lowry.

A temperatura de solubilidade das amostras, o intervalo de quantificação e a presença de interferentes ao método, foram considerados os fatores mais importantes para este estudo da quantificação de proteínas residuais nos polissacarídeos do *Haemophilus influenzae* tipo b.

Segundo Zaia (1998), algumas das principais substâncias interferentes e problemas associadas ao ensaio de Lowry são lipídios (turbidez das amostras); detergentes (formação de precipitado); glicídios (falso positivo); compostos fenólicos (falso positivo); sulfato de amônio (diminuição da absorvidade); ácidos nucleicos (aumento da absorção das amostras).

A quantidade de resíduos químicos de análise também foi avaliada como uma desvantagem. Segundo Pereira (2016), há alguns anos Bio-Manguinhos promove ações de conscientização dos trabalhadores a fim de produzir o menor impacto possível de suas atividades ao meio ambiente tais como o gerenciamento de resíduos e manutenção da área verde no campus.

## 1.6 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Segundo Peterson (1977), os métodos espectrofotométricos são os mais adequados à rotina de análises devido à simplicidade, rapidez, custos e intervalos de quantificação.

Os métodos para a quantificação de proteínas são muito variados, no entanto os mais utilizados são os espectrofotométricos biureto, Lowry, Bradford, Smith e absorção no ultravioleta. Com exceção do método de absorção no ultravioleta, que se baseia na absorção da luz das ligações peptídicas dos aminoácidos que constituem as proteínas, os demais se baseiam nos cromóforos resultantes de reações com as proteínas. Como não há uma metodologia de uso universal, novos métodos têm sido propostos e outros aperfeiçoados ao longo dos anos (ZAIA, 1998).

Segundo Peterson (1983), as estimativas confiáveis da quantidade absoluta de proteínas totais deveriam ser feitas com quantidades conhecidas da mesma proteína ou pela calibração do método usado com um procedimento confiável tal como análise de aminoácidos totais, pois os métodos espectrofotométricos, que são relativamente simples, não dão a mesma resposta com proteínas diferentes. Como tais procedimentos são em geral impraticáveis para a rotina dos laboratórios, são utilizadas estimativas relativas da quantificação de proteínas e não a quantificação absoluta.

Os métodos espectrofotométricos considerados mais sensíveis, segundo Wilson e Walker (2010), são Lowry, Bradford e Smith. O autor afirma que seus limites de detecção são respectivamente 10, 20 e 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  porém, nada relata quanto ao método de Peterson.

### 1.6.1 Seleção dos métodos analíticos

A primeira etapa essencial de uma análise quantitativa é a seleção do método e uma das primeiras questões a ser considerada no processo de seleção é o nível de exatidão requerido. A complexidade e o número de componentes presentes da amostra também podem influenciar a escolha do método (SKOOG, 2008).

Segundo Olson e Markwell (2007), a compatibilidade da amostra com o método é um dos aspectos mais difíceis na determinação de proteínas, portanto é importante conhecer a composição da amostra e dos reagentes envolvidos no método.

A decisão de escolha entre os diversos métodos que podem ser utilizados depende de vários fatores, entre os quais a disponibilidade de equipamentos, a precisão, o limite de detecção e acurácia, a presença de interferentes e o custo (WILSON; WALKER, 2010).

Após uma avaliação teórica preliminar dos métodos espectrofotométricos elegíveis (UV, biureto, Peterson, Smith e Bradford) foram identificados os mais adequados à fase experimental de comparação com o método de Lowry. A figura 4 esquematiza os parâmetros avaliados neste estudo.

Os cinco métodos citados foram avaliados teoricamente quanto à especificidade, variabilidade entre proteínas diferentes, a sensibilidade relativa à albumina soro bovino, o tempo de análise e o custo. Também foi avaliada a quantidade de amostra requerida para análise e a quantidade de resíduos químicos produzida.

Figura 4 - Parâmetros avaliados para substituição do método de quantificação de proteína residual do PRP.



Fonte: (Ilustração do autor).

A quantidade de amostra requerida para análise é importante pois a cada processo de purificação são produzidos apenas aproximadamente 50 g de PRP e a avaliação da quantidade de resíduos químicos produzidos pelos métodos em estudo, foi no sentido de contribuir nas ações de minimização de impactos ambientais nas atividades de Bio-Manguinhos. As características dos métodos citados são descritas a seguir.

#### 1.6.1.1 O método Lowry

Devido à sua simplicidade, precisão e sensibilidade e principalmente pela popularidade, o método clássico de Lowry, é largamente utilizado para determinação de

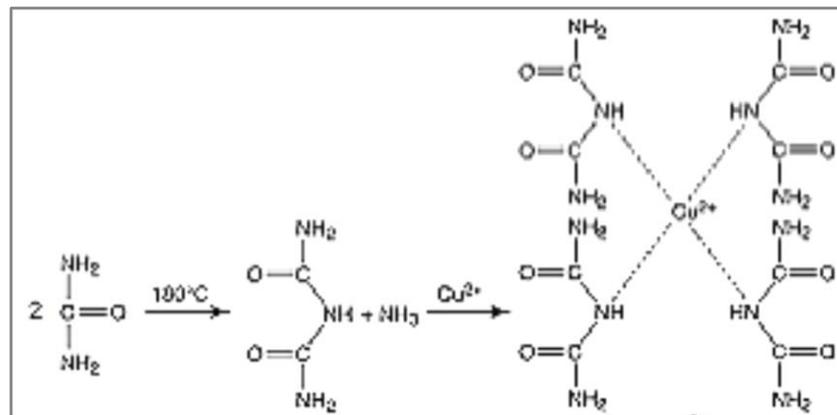
proteínas totais, e em consequência tem sido alvo de extensivas avaliações durante muitos anos (PETERSON, 1979).

No método Lowry, a amostra é tratada com uma solução alcalina de cobre seguida por um reagente fenólico. A cor é desenvolvida em decorrência da redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico para um heteropoliácido azul (SKOOG, 2008).

Segundo Lowry et al (1951), as duas etapas que levam a coloração final com as proteínas são a reação com cobre em meio alcalino e a redução do reagente fosfomolibidítico-fosfotungístico pela reação da proteína com o cobre (figura 5).

O cromógeno misto ( $3 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13 \text{ WO}_3 \cdot 5 \text{ MoO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$  e  $3 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14 \text{ WO}_3 \cdot 4 \text{ MoO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ ) é reduzido por uma reação rápida com os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano e uma reação lenta do quelato de cobre com a cadeia peptídica, A forma reduzida do reagente de Folin Ciocalteu tem absorção máxima a 750nm (PETERSON, 1979).

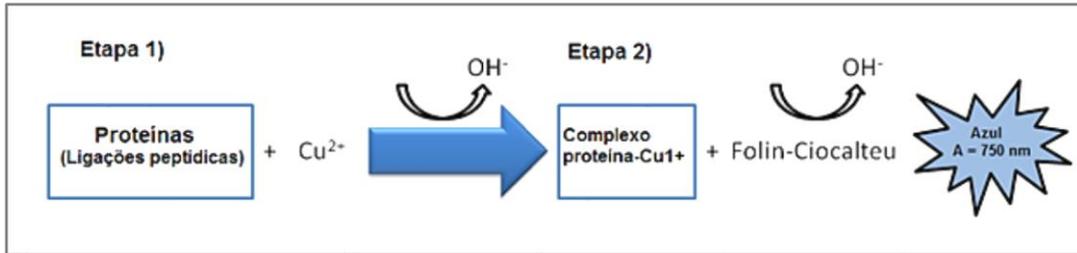
Figura 5 - Ilustração esquemática da redução do íon  $\text{Cu}^{2+}$  pela proteína em meio alcalino (Reação do biureto).



Fonte: (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

Na segunda etapa da reação o reagente de Folin-Ciocalteu é adicionado e a coloração máxima resulta da redução do reagente que ocorre em pH 10. A figura 6 ilustra o mecanismo da reação.

Figura 6 - Mecanismo da reação do método Lowry.



Fonte: (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

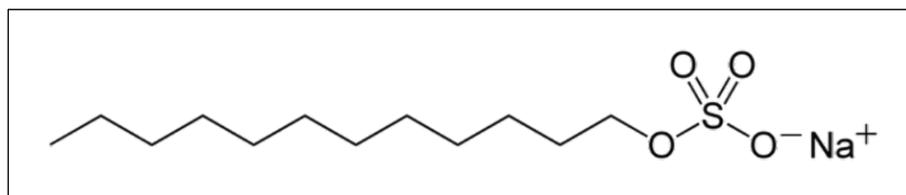
Segundo Wilson e Walker (2010), este método apresenta baixa variabilidade com diferentes proteínas e é relativamente sensível, com limite de detecção abaixo de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 1.6.1.2 O método Peterson (método Lowry modificado)

A principal vantagem do método de Peterson, é promover melhor solubilidade das amostras (PETERSON, 1983). Este método também prevê a precipitação quantitativa aplicada à amostras em concentrações muito baixas, como no caso de proteínas residuais.

Segundo Peterson (1979), este método foi desenvolvido para solucionar os problemas relacionados a substâncias interferentes, tempo do ensaio, estabilidade dos reagentes e intervalo de linearidade da curva de calibração apresentados pelo método de Lowry et al (1951). A principal modificação ao método original de Lowry foi a adição de SDS (figura 7).

Figura 7: Fórmula estrutural do dodecil sulfato de sódio (SDS)



Fonte: (Adaptado de MARZZOCO; TORRES, 1999).

A ação surfactante do SDS, promove condições brandas para a rápida desnaturação das proteínas em geral, pois associa-se aos radicais apolares no interior da molécula proteica, rompendo as interações hidrofóbicas que mantem sua estrutura nativa. Isto ocorre porque os grupos alquil apolares das moléculas de SDS permanecem em contato com as superfícies

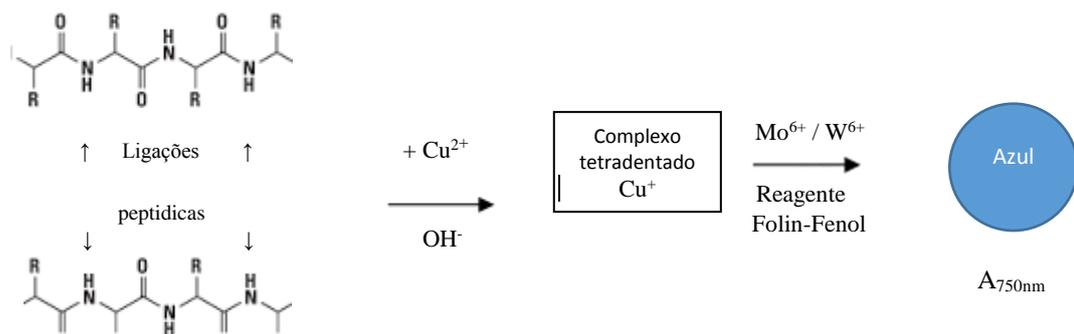
hidrofóbicas enquanto os grupos sulfato (iônicos), interagem com a fase aquosa (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Outras melhorias propostas por Peterson (1979) foram o aumento das concentrações dos reagentes e o uso de desoxicolato de sódio (DOC) e TCA para a recuperação de proteínas, em soluções muito diluídas contendo substâncias interferentes.

O mecanismo do método de Peterson é semelhante ao de Lowry: a produção de cor ocorre em duas etapas (figura 8). A primeira etapa da reação ocorre com o sulfato de cobre alcalino na presença de tartarato à temperatura ambiente, o complexo de cobre tetradentado forma quatro ligações peptídicas e na segunda etapa a produção de cor ocorre pela transferência de elétrons do complexo de cobre tetradentado para o reagente fosfomolibídico-fosfotungístico (PETERSON, 1983).

Outra característica semelhante ao método clássico de Lowry é a baixa variabilidade entre proteínas diferentes (PETERSON, 1979; MIWA, 2003).

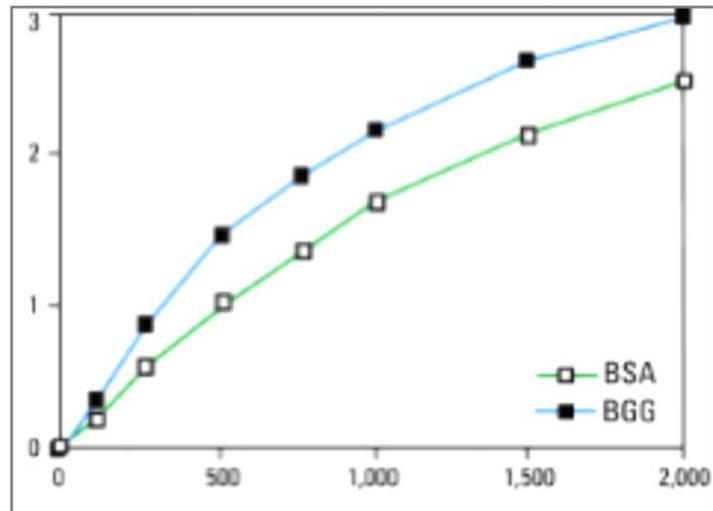
Figura 8 - Mecanismo da reação do método Peterson (1983).



Fonte: (Adaptado de THERMO SCIENTIFIC, 2010).

No método Peterson, a linearidade é prevista para uma pequena porção da curva, aproximadamente na região de concentrações de proteínas, inferiores a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , como pode ser observado na figura 9.

Figura 9 - Conc. de proteínas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) x Absorvância (750nm).  
Curvas obtidas com o método de Peterson (1983) usando albumina de soro bovino (BSA) e gama globulina bovina (BGG).



Fonte: (THERMO SCIENTIFIC, 2010)

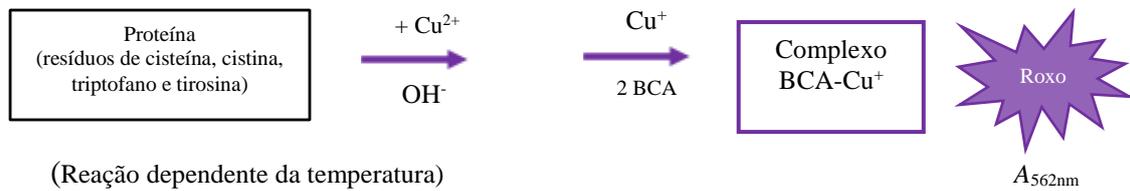
As pequenas alterações aqui propostas ao método de Peterson para determinação de proteínas residuais totais do PRP foram a utilização de volumes de alíquotas de 200 e 400  $\mu\text{L}$  para os padrões e amostras e o ajuste da curva de calibração padrão para o intervalo de medição entre 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 1.6.1.3 O método Smith

Segundo Zaia (1998), as vantagens do uso do método de Smith et al (1985) em relação ao método de Lowry et al (1951) são a compatibilidade com detergentes, ser um pouco mais rápido e a quantidade de amostra requerida (alíquotas de 100 $\mu\text{L}$ ). Porém as desvantagens são a incompatibilidade com agentes redutores e a coloração continuar a se desenvolver após o período de incubação à temperatura ambiente, para superar este problema, utiliza-se temperaturas de incubação mais elevadas, de 37 e 60°C.

Segundo Smith et al (1985), a coloração da reação produzida por este ensaio é formada pela quelação de duas moléculas do ácido bicinonínico (BCA) com um íon cobre. A detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais pelo método BCA é dada pela redução do íon  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^+$  pelas proteínas em meio alcalino (reação do biureto) e o cátion cobre ( $\text{Cu}^+$ ), é detectado colorimetricamente, cujo mecanismo é esquematizado na figura 10.

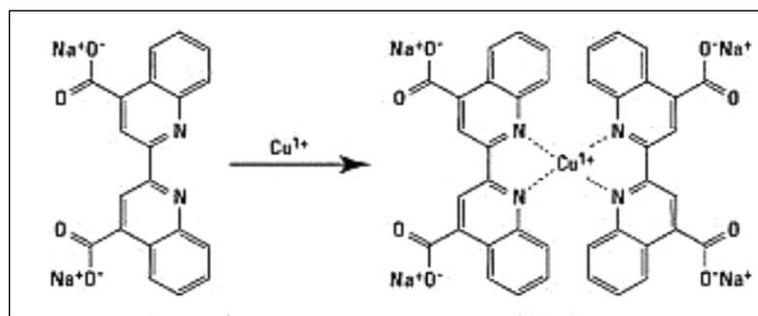
Figura 10 - Mecanismo da reação do método Smith et al (1985).



Fonte: (Adaptado de THERMO SCIENTIFIC, 2010)

O produto da reação, um complexo solúvel em água, exibe forte absorvância a 562 nm com o incremento da concentração de proteínas no intervalo de 20 a 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , conforme a figura 11.

Figura 11 – Reação esquemática do ácido bicinconínico com íon  $\text{Cu}^+$

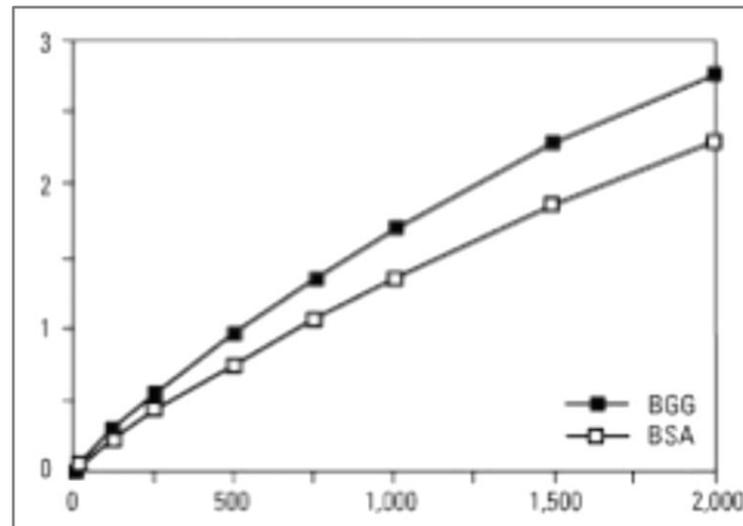


Fonte: (JOHNSON, 2012).

A estrutura macromolecular da proteína, o número de ligações peptídicas e a presença de quatro aminoácidos em particular (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) são relatados como responsáveis pela formação da coloração na reação com o BCA. A concentração de proteínas é geralmente determinada e relatada em relação a padrões de uma proteína comum tal como albumina de soro bovino (BSA) e a concentração de cada amostra desconhecida é determinada com base em uma curva de calibração (SMITH et al, 1985).

A figura 12 esquematiza a relação concentração x resposta para o método de Smith et al (1985).

Figura 12 - Concentração de proteínas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) x Absorvância (562nm). Curvas obtidas com o método de Smith et al. (1987) usando albumina de soro bovino (BSA) e gama globulina bovina (BGG).



Fonte: (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

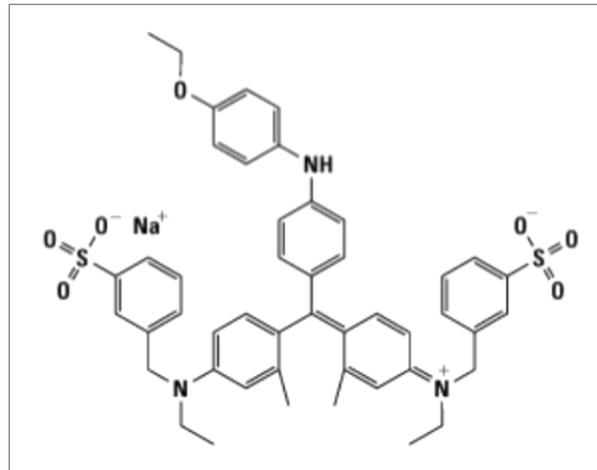
Segundo Zaia (1998), as principais substâncias interferentes para o método de Smith et al (1985), devido aos efeitos na redução do  $\text{Cu}^{2+}$ , são glicídeos, lipídios, peróxido de hidrogênio (falso positivo); EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) que complexa os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e o sulfato de amônio (falso negativo).

A sensibilidade do método Smith, segundo Zaia (1998) é semelhante ao de Lowry; Wilson e Walker (2010), cita o método de Smith como sendo muito mais sensível, mas não descreve as condições utilizadas e para um terceiro autor, Johnson (2012), o método do ácido bicinconínico é capaz de detectar concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 1.6.1.4 Método Bradford

Segundo Olson e Markwell (2007), o método de Bradford, tem como vantagens a rapidez, o custo do reagente, a estabilidade e a compatibilidade com agentes redutores. As maiores desvantagens é a grande variabilidade entre proteínas diferentes e apresentar resposta anormal em relação à albumina de soro bovino. A figura 13 representa a estrutura do corante azul de Comassie brilhante C-250. A figura 14 representa esquematicamente a reação do método Bradford (1976).

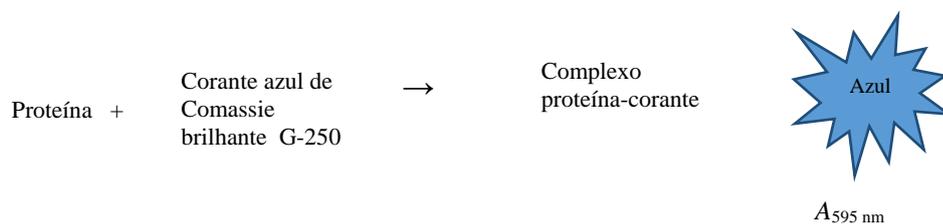
Figura 13 - Estrutura do corante azul de Coomassie brilhante G-250. Formula molecular  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$



Fonte: (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

Este método é baseado na ligação do corante azul de Coomassie brilhante G-250 (CBBG) às proteínas. A reação ocorre em dois minutos e permanece estável por aproximadamente uma hora. O CBBG na forma livre tem absorção máxima à 470 e 650nm. Na forma marrom, apresenta absorvância máxima em 470 nm e na forma azul a absorbância máxima em 610 nm, sendo preferível realizar as determinações quantitativas de proteínas a 595 nm, pois é neste comprimento de onda que se encontra a maior diferença entre as duas formas (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

Figura 14 - Representação esquemática do método Bradford



Fonte: (Adaptado de THERMO SCIENTIFIC, 2010).

Este método é capaz de detectar concentrações de 1  $\mu\text{g mL}$ , mas seu aspecto crucial é a determinação do nível zero (branco de reagentes), pois o ensaio apresenta resposta não

linear à concentração de proteínas, sendo muito importante certificar-se da determinação do nível zero para a construção da curva de calibração para evitar erros de quantificação, além disto, recomenda-se não utilizar BSA como padrão de calibração deste método, pois produz respostas anômalas (absorvâncias mais altas) em comparação aos outros métodos espectrofotométricos. (OLSON; MARKWELL, 2007).

O método de Bradford é indicado principalmente para determinação quantitativa de proteínas contendo resíduos de arginina, lisina e histidina, pois o CBBG não se liga a peptídeos de baixa massa molecular (ZAIA, 1998).

#### *1.6.1.5 Método absorção no ultravioleta (UV)*

Segundo Wilson e Walker (2010), a absorção no UV tem como vantagens a rapidez e ser um método não destrutivo. A baixa especificidade é a principal desvantagem pois diversas outras substâncias absorvem no UV.

As proteínas absorvem na região de 280 nm devido principalmente aos aminoácidos tirosina e triptofano e abaixo de 220 nm devido às ligações peptídicas (ZAIA, 1998).

Segundo Olson e Markwell (2007), a detecção no UV é muito menos sensível que os métodos de Lowry, Smith e Bradford.

#### *1.6.1.6 Método biureto*

O método do biureto é um dos mais empregados na determinação de proteínas totais, segundo Skoog et al (2008).

A vantagem deste método é a rapidez, simplicidade e a exatidão. O reagente contendo íons cúpricos é utilizado para promover a formação de um complexo de cor violeta com as ligações peptídicas das proteínas. É um método linear e sua absorvância máxima é a 540nm. (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

Segundo Lowry et al (1951), a maior vantagem do método biureto é a baixíssima variabilidade entre proteínas diferentes, no entanto é 100 vezes menos sensível que a sua proposta para a quantificação de proteínas totais.

O método é utilizado desde 1915, é rápido, apresenta baixa variação de absorvidade específica para diversas proteínas e utiliza reagentes de baixo custo. Porém, a sua maior desvantagem é ser pouco sensível. O produto da reação absorve em duas regiões, uma a 270 nm e outra a 540 nm, sendo esta última, a mais utilizada para fins analíticos (ZAIA, 1998).

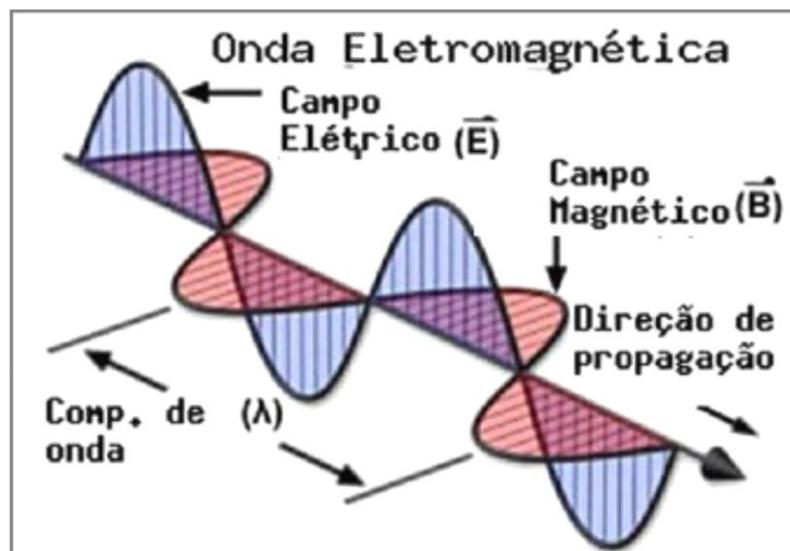
## 1.7 FUNDAMENTOS BÁSICOS DA ESPECTROFOTOMETRIA

Medidas com grande exatidão para a determinação quantitativa de proteínas podem ser realizadas em pouco tempo com o uso da espectrofotometria (OLSON; MARKWELL, 2007).

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se na medida da interação entre a radiação eletromagnética e os átomos ou as moléculas do analito ou ainda na produção de radiação pelo analito (SKOOG, 2008).

Segundo Harris (2010), a espectrofotometria pode ser definida como toda técnica analítica que usa a luz para medir as concentrações das soluções, através da interação da luz com a matéria. Nas interações entre radiação e matéria para fins analíticos, é conveniente considerar a luz constituída por fótons. Os tipos específicos de interações observadas dependem da energia da radiação empregada e do modo de detecção. A luz descrita em termos de partículas e ondas consiste de campos elétricos e magnéticos oscilantes perpendiculares, como representada na figura 15.

Figura 15 - Onda plano polarizada. O comprimento de onda de radiação Eletromagnética se propaga em uma única direção, na velocidade  $c$ , perpendicular ao campo elétrico da luz também confinado a um único plano.



Fonte: (adaptado de HARRIS, 2010)

Ainda segundo Harris (2010), o número de onda e a frequência são diretamente proporcionais à energia do fóton e o comprimento de onda é inversamente proporcional à

energia. Pode-se relacionar a energia de um fóton com seu comprimento de onda ( $\lambda$ ) e a frequência ( $\nu$ ), conforme a equação 1.

$$E = h\nu = hc / \lambda = hc\tilde{\nu}$$

(Equação 1)

Onde,

$h$  é a constante de Planck ( $6,626 \times 10^{-34}$  J s);

$\lambda$  a distancia em metros, de um pico ao outro da onda;

$\nu$ , o grau de oscilação das ondas, em função da velocidade da luz no vácuo;

$c$  a velocidade da luz ( $c = 2,998 \times 10^8$  m s<sup>-1</sup>);

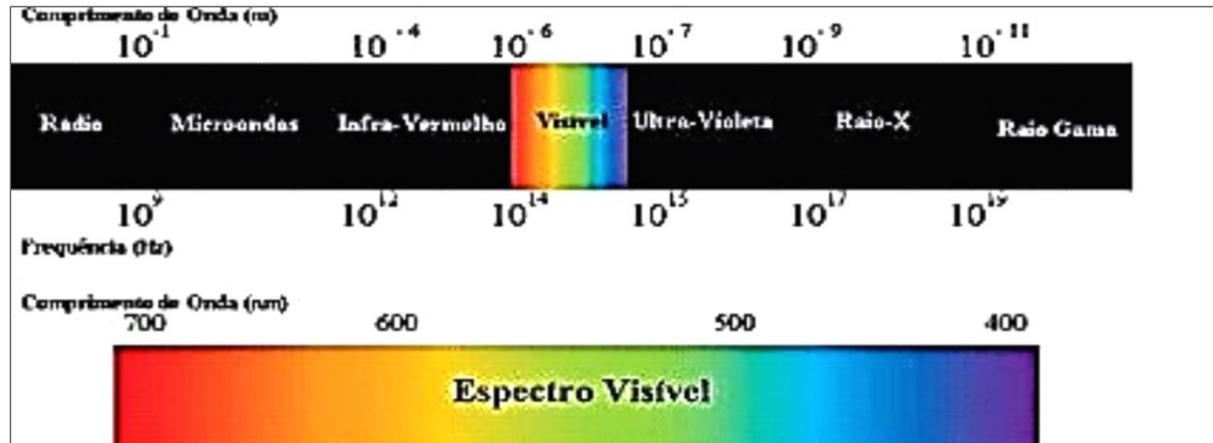
$\tilde{\nu} = (1/\lambda)$ , número de onda, em cm<sup>-1</sup>.

No caso de quantificação de proteínas, as regiões de interesse são aquelas compreendidas no comprimento de onda do visível, onde absorvem substâncias coloridas e no ultravioleta (UV), onde as proteínas absorvem fortemente em 280 nm devido às ligações peptídicas. Através de um espectrofotômetro, pode-se medir a concentração dos cromóforos e a absorção seletiva da radiação transmitida por uma amostra em solução (NELSON; COX, 2002).

Segundo Skoog et al (2008), um espectrofotômetro é um instrumento espectroscópico que utiliza um monocromador juntamente com um transdutor para converter as intensidades radiantes em sinais elétricos. No comprimento de onda selecionado é possível registrar-se um espectro de absorção e obter um número (absorbância), que é diretamente proporcional à concentração da espécie, através da medida da razão entre as potências de dois feixes. Para usar a absorbância com finalidade analítica, uma curva de calibração deve ser gerada pela medida da absorbância de várias soluções contendo concentrações conhecidas do analito.

Na figura 16, o espectro eletromagnético, representa os comprimentos de onda correspondente a cada radiação. A luz visível é uma radiação eletromagnética de comprimentos de onda de aproximadamente 400 a 700 nm, correspondente a uma pequena parte do espectro eletromagnético que vai do violeta até o vermelho.

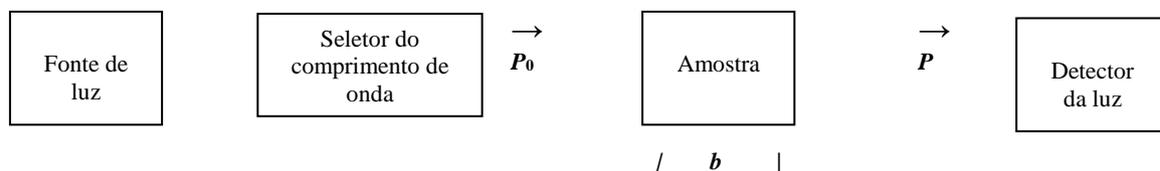
Figura 16 - O espectro da radiação eletromagnética e a energia dos fótons no intervalo visível do espectro.



Adaptado de: (NELSON; COX, 2002).

Comprimentos de onda menores (e frequências elevadas) correspondem a energias maiores. Quando um fóton é absorvido, um elétron da molécula que o absorveu (cromóforo) é deslocado para um nível superior de energia. Para ser absorvido, um fóton deve conter uma quantidade de energia (um quantum) que iguale exatamente à energia da transição eletrônica. Uma molécula que recebeu um fóton está em estado excitado e o elétron deslocado para um orbital superior de energia, geralmente retorna rapidamente ao seu orbital de menor energia e a molécula excitada decai para o estado fundamental de menor energia fornecendo o quantum absorvido, como luz, calor ou ainda para realizar um trabalho químico. A emissão da luz que acompanha o decaimento das moléculas excitadas é sempre de um comprimento de onda maior (energia menor) que o da luz absorvida (NELSON; COX, 2002).

Figura 17 - Diagrama esquemático de um experimento espectrofotométrico de feixe simples.  $P_0$  é a irradiação do feixe de luz entrando na amostra;  $P$ , irradiação do feixe de luz saindo da amostra;  $b$ , caminho óptico através da amostra.



FONTE: (Adaptado de HARRIS, 2010).

Segundo Harris (2010), quando a luz é absorvida por uma amostra, a irradiação do feixe de luz é diminuída. Quando a luz passa através de um monocromador (prisma ou filtro) para selecionar um comprimento de onda, a luz monocromática, com irradiação  $P_0$ , passa por uma amostra de comprimento  $b$  e a irradiação do feixe que emerge para o outro lado da amostra é  $P$ . Alguma luz pode ser absorvida pela amostra, então  $P \leq P_0$ . Um experimento espectrofotométrico pode ser representado pela figura 17.

A transmitância  $T$ , é definida como a fração da luz original que passa através da amostra:

$$T = P / P_0$$

Equação 2

Quando nenhuma luz é absorvida  $P = P_0$ ,  $A=0$ . Se 90% da luz é absorvida, 10% é transmitida e  $P = P_0 / 10$ , então  $A = 1$ ; se 1% da luz é transmitida,  $A = 2$ . Então, a absorvância ( $A$ ) pode ser definida como

$$A = \log a (P_0 / P) = - \log T$$

Equação 3

A Lei de Lambert-Beer, aplicada à química analítica é o núcleo da espectrofotometria e pode ser definida como:

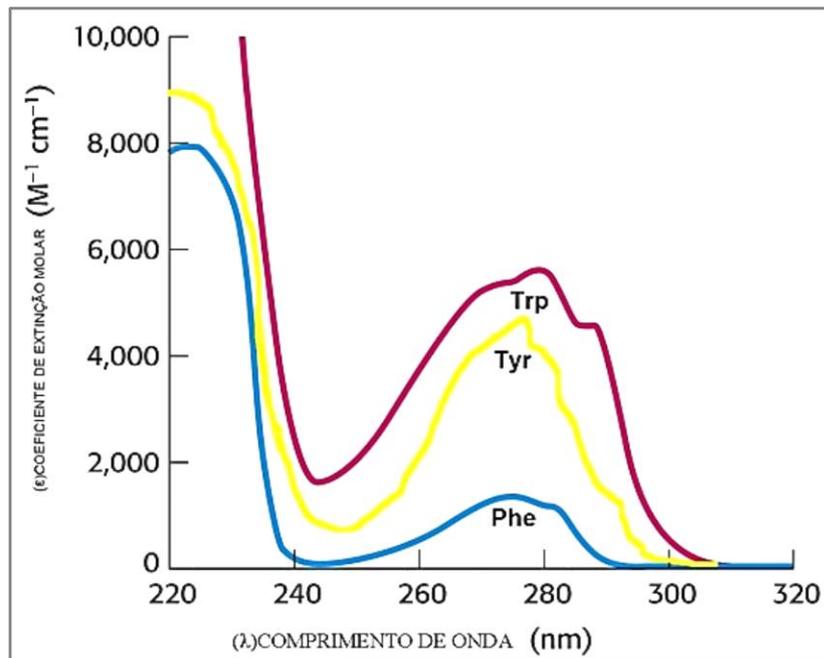
$$A = \epsilon b c$$

Equação 4

A concentração da amostra é dada em moles por litro ( $M$ ) e o caminho ótico ( $b$ ) em centímetros e a absortividade molar ( $\epsilon$ ), em  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Portanto, absorvância ( $A$ ), é adimensional e diretamente proporcional à concentração ( $c$ ) das espécies que absorvem a luz na amostra. Absortividade molar é uma constante determinada experimentalmente, característica de uma determinada substância e demonstra quanto de luz é absorvido a um dado comprimento de onda (HARRIS, 2010).

A figura 18, representa a absorvância da luz pelas proteínas no comprimento de onda de 280 nm.

Figura 18 - Absortividade molar. Absorção de luz em virtude da estrutura química das proteínas e das ligações peptídicas.



FONTE: (Adaptado de NELSON; COX, 2002)

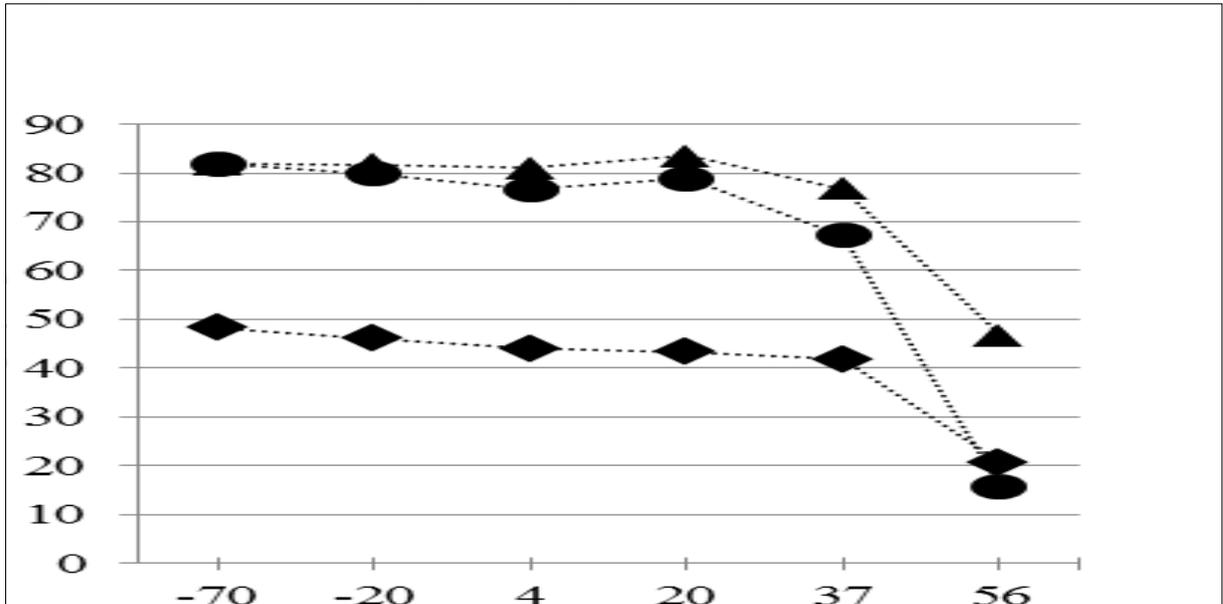
## 1.8 PREPARO DAS AMOSTRAS

Segundo Skoog et al (2010), poucas propriedades químicas e físicas de importância na química analítica são específicas, portanto antes que a medida final seja feita deve ser traçado um plano a fim de isolar o analito de substâncias interferentes, pois este pode ser o aspecto mais crítico de uma análise. Por isto, foi estudado o processo produtivo de purificação do produto vacinal PRP (poliribosil ribitol fosfato) e do preparo das vacinas de *H. Influenzae* tipo b Hib.

A molécula íntegra do PRP não caracteriza o efeito redutor da ribose, pois para ocorrer a reação para açúcar redutor com o polímero é necessário realizar uma reação de hidrólise, sem isto os carbonos anoméricos permanecem ligados entre as unidades monoméricas do PRP (CRISEL et al, 1975).

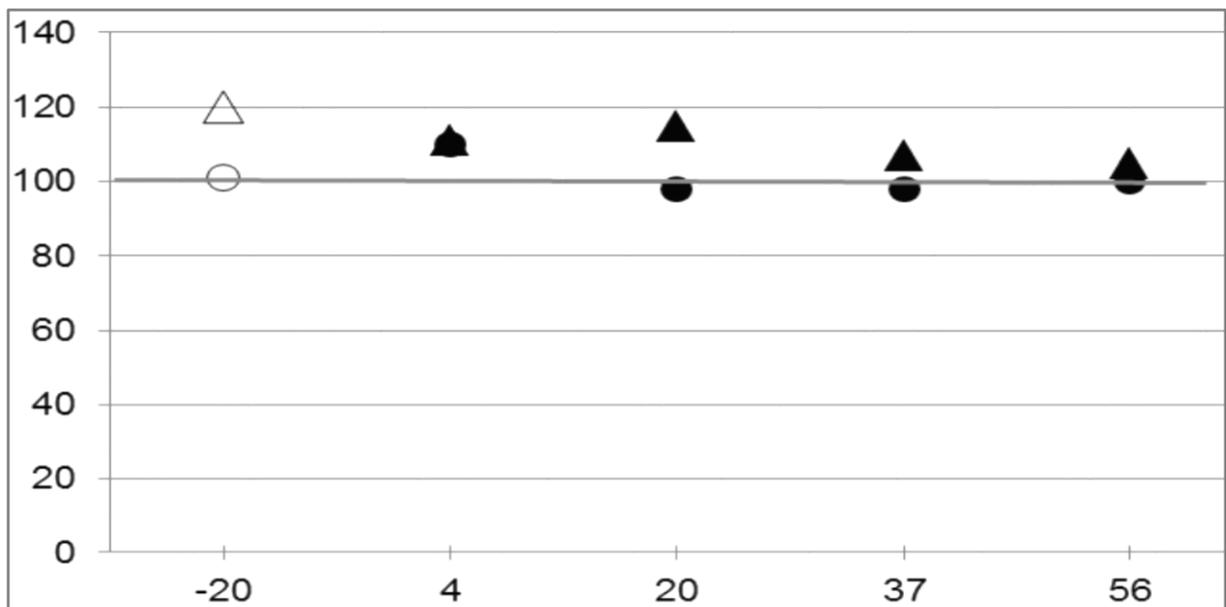
De fato, em geral é necessário promover uma hidrólise para que sejam rompidas as ligações covalentes dos polissacarídeos para que a ribose apresente poder redutor. Porém, tratando-se de biomoléculas, condições brandas (como a temperatura de 60°C utilizada para secagem das amostras de PRP), também podem desencadear reações químicas nos biopolímeros (NELSON; COX, 2002).

Figura 19 - Gráfico: Temperatura (°C) x Eluição  $K_D$  0,45. Estabilidade do PRP após 6 meses de incubação em diferentes temperaturas. Dados das amostras 12/218 (●) e 12/306 (▲), comparados com dados de 5 meses (degradação acelerada) e 6 meses (tempo real) do 1º padrão PRP 02/2008 (◆).



Fonte: (WHO, 2014).

Figura 20 - Gráfico: Temperatura (°C) x Conteúdo de PRP (%). Conteúdo de PRP após 12 m. de incubação em diferentes temperaturas. Tempo real (símbo. abertos) e degradação acelerada (símbo.fechados). Candidato 1, 12/218 (○,●) e candidato 2, 12/306 (△,▲), relativos à linha de base do controle. O conteúdo de PRP foi determinado pelo ensaio de ribose.



Fonte: (WHO, 2014)

Um estudo recente da WHO (2014) avaliou o efeito da temperatura sobre o conteúdo de PRP demonstrando que submeter o PRP a temperaturas acima de 37°C interfere no

conteúdo de PRP (Figura 19), mas não interfere na concentração de ribose e de fósforo das amostras (figura 20).

Apesar de não fornecerem dados relativos ao impacto da temperatura na quantificação de proteínas residuais do PRP, pode-se inferir que submeter a amostra à temperaturas acima de 56°C favorece a formação de produtos de degradação, possíveis interferentes para dosagem das proteínas (figura 19). Portanto, a secagem prévia à 60°C por 90 minutos, foi considerada inadequada para o preparo das amostras, visto o acentuado decréscimo do conteúdo de PRP nestas condições, além disto, segundo as recomendações da *American Cyanamid Company* (1980), *Smithkline Beecham Biologicals S. A.* (1999) e Uclaf e Brossard et al (1980) entre outras, deve-se manter as amostras de PRP à temperaturas próximas de 0°C.

Nas condições recomendadas, os métodos utilizados neste estudo não favorecem as reações de degradação dos polissacarídeos, exceto o de Smith, que prevê a possibilidade do uso de temperaturas de incubação à 37 ou 60°, portanto este fator será avaliado experimentalmente.

## 1.9 AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE VACINAS, BIOFÁRMACOS E REATIVOS PRODUZIDOS EM BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ

Para garantir que determinado método é apropriado para a finalidade pretendida, deve-se garantir, por meio de estudos experimentais que atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003a).

Os parâmetros de desempenho recomendados para processos de validação de métodos para determinação de impurezas estão descritos em publicações oficiais específicas como a RDC n° 27, de 17/05/2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para fins de registro e pós-registro de medicamentos (BRASIL, 2012a); Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003, que determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" (BRASIL, 2003a); Resolução n° 17 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 19/04/2010, que determina o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos (BRASIL, 2010).

Segundo a Anvisa, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos, se aplicam a técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); ou ainda a métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável tais como a titulometria e a espectrofotometria UV-Vis (BRASIL, 2003a).

Além das legislações mencionadas, outros documentos relatam critérios e procedimentos de validações genéricos ou não, específicos à área, mas que podem ser aplicados tais como os descritos pelo Inmetro (2011). Serão descritos a seguir somente os parâmetros avaliados nesta dissertação:

- ✓ Seletividade e efeito matriz;
- ✓ intervalo de medição e intervalo linear;
- ✓ linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade;
- ✓ limite de detecção (LD);
- ✓ limite de quantificação (LQ);
- ✓ exatidão (expressa como recuperação);
- ✓ precisão (repetibilidade).

#### 1.9.1 Seletividade e efeito matriz

Seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e o padrão interno (PI) na presença de outros componentes da amostra (BRASIL, 2003a).

Segundo o Inmetro (2011), a matriz da amostra pode reduzir ou aumentar o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Portanto, o efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou padrão interno (PI) causado por componentes da matriz. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

#### 1.9.2 Intervalo de medição e intervalo linear

É o intervalo especificado 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 os

parâmetros de exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Segundo o Inmetro (2011), o intervalo de trabalho deve cobrir o intervalo de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

### 1.9.3 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003a).

Segundo o Inmetro (2011), a quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

Uma curva de calibração linear é preferível devido a sua simplicidade matemática e por tornar mais fácil a detecção de uma resposta anômala. e assim pode-se empregar um número menor de padrões e um procedimento de regressão linear (SKOOG, 2008).

### 1.9.4 Limite de detecção (LD)

É a menor quantidade de analito presente em uma amostra que possa ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o mínimo valor detectável (BRASIL, 2003a).

### 1.9.5 Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. É um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. É estabelecido por meio de análise de soluções

contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003a).

#### 1.9.6 Exatidão (recuperação)

É definido como a proximidade do resultado obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para determinação da exatidão estão disponíveis. Uma delas é utilizando um padrão de referência com valor conhecido. Nos casos em que amostras de todos os componentes estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição do padrão. Para a impureza, pode-se adicionar quantidades conhecidas da mesma substância. A exatidão é calculada como porcentagem da recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003a).

Segundo o VIM (2012), a exatidão de medição ou acurácia é “o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando” uma medição é dita mais exata quando fornece um erro de medição menor (diferença entre o valor medido de uma grandeza e um valor de referência). Um valor de referência com a sua incerteza de medição associada é geralmente relacionado a um material de referência certificado.

#### 1.9.7 Precisão (repetibilidade)

É a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade expressa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas.

O valor máximo aceitável deve ser de acordo com a metodologia aplicada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, admitindo-se para os ensaios bioanalíticos < 15% (BRASIL, 2012a).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar e comparar os diferentes métodos espectrofotométricos para a quantificação de proteínas residuais presentes em produtos vacinais;

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar a solubilização das amostras de PRP considerando a natureza dos solventes, temperatura experimental e tempo;
- ✓ Verificar as vantagens e desvantagens dos métodos mais usados para determinação de proteína residual relacionadas ao método atualmente utilizado no controle de qualidade de proteína residual no produto vacinal PRP;
- ✓ Propor um método para substituir o método de Folin-Lowry, utilizado no controle de qualidade de proteína residual do produto vacinal PRP;
- ✓ Comparar os resultados obtidos entre o método proposto e o método atualmente usado para comprovar que é adequado ao que se deseja.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Padrões

O padrão utilizado foi Albumina de Soro Bovino (BSA), na concentração de 2,0 mg/mL em NaCl 0,9% e conservante azida de sódio (nº catálogo 23209, lote nº ML165950, Thermo Fisher Scientific, EUA) em ampolas de vidro seladas, cada uma contendo 1,0 mL de solução.

Trata-se do mesmo lote do padrão certificado, rastreável ao padrão NIST 927d, na concentração de  $2,03 \pm 0,03$  mg/mL (nº catálogo 23209, lote nº ML165950, Thermo Fisher Scientific, EUA) em ampolas de vidro seladas contendo 2 mL.

Os padrões foram estocados em câmara fria na temperatura de 2-8 °C durante o período de desenvolvimento do trabalho.

##### 3.1.2 Reagentes e solventes

- a) Reagente de fenol Folin-Ciocalteu 2 N (Merck, Alemanha);
- b) hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha);
- c) hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (Merck, Alemanha);
- d) sulfato de cobre (II) penta hidratado P.A. (Merck, Alemanha);
- e) tartarato de sódio e potássio P.A. (Merck, Alemanha);
- f) carbonato de sódio P.A. (Merck, Alemanha);
- g) dodecil sulfato de sódio (SDS) P.A. (Merck, Japão);
- h) desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- i) kit *bicinchoninic acid protein assay* (nº catálogo BCA-1, Sigma-Aldrich, Alemanha). Cada kit é composto de 1 frasco de 1000 mL contendo solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 11,25), 1 frasco de 25 mL de solução de sulfato de cobre (II) penta hidratado a 4% (p/v) e 5 ampolas de 1 mL de solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> em NaCl 0,15 mol.L<sup>-1</sup> com azida sódica a 0,05% como preservante;
- j) água ultrapura tipo 1, obtida diariamente do sistema Milli-Q, modelo Direct, (Millipore, EUA) instalado no laboratório de controle microbiológico (LACOM), de Bio-Manguinhos.

### 3.1.3 Equipamentos e acessórios

- a) Espectrofotômetro de absorção molecular UV-Visível controlado por computador, com interface USB e software com métodos para análises quantitativas, modelo Cary 60. Utilizado na versão do método 5.0.0.999 e modo de leitura simples (Agilent, EUA);
- b) cubetas de quartzo, com duas faces laterais polidas escuras de 10 mm de caminho ótico e volume 1,4 mL e 0,5 mL (Thomas Scientific, EUA);
- c) analisador de umidade resolução 0,001 g, modelo MA100 (Sartorius, Alemanha);
- d) balança analítica com resolução de 0,1 mg, modelo CP225D, com registrador gráfico (Sartorius, Alemanha);
- e) pipetas automáticas de volume variável entre 10-100 µL, 100-1000 µL e 500-5000 µL (Eppendorf, EUA);
- f) ponteiros originais descartáveis de 100-5000 µL, 50-1000 µL e 2-200 µL (Eppendorf, EUA);
- g) sistema de obtenção de água ultrapura tipo I, Milli-Q Direct (Millipore, EUA);
- h) balões volumétricos calibrados, volumes de 10 mL e 20 mL;
- i) agitador magnético, modelo M-41 (Yamata, Japão);
- j) agitador de tubos digital IKA tipo vortex, modelo MS3 (Sigma, Alemanha);
- k) banho ultratermostatzado, modelo NTT-211 (EYELA, Japão);
- l) tubos de ensaio de vidro com tampa 10 x 100 mm;
- m) tubos de ensaio de vidro 5 x 70 mm;
- n) tubos descartáveis de polipropileno com tampa (Eppendorf, EUA);
- o) capela de exaustão;
- p) câmara fria com temperatura no intervalo entre 2-8 °C;
- q) termômetro de 10-110 °C;
- r) tubos de centrífuga de polipropileno com capacidade para 15 mL;
- s) *vials* descartáveis de vidro e de polipropileno com capacidade para 1,5 mL (Waters, EUA);
- t) *vials* de polipropileno com capacidade para 5,0 mL (ThermoFisher Scientific, EUA);
- u) parafilme;
- v) estantes para tubos;
- w) frascos de vidro e de polipropileno com tampa;
- x) lenços de papel;
- y) lenços de tecido sintético.

### 3.1.4 Amostras

As amostras de poliribosil-ribitol fosfato (PRP) foram fornecidas pelo Departamento de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos (Divisão de Purificação de Polissacarídeos). 1,5 g de três lotes experimentais de PRP foram disponibilizados para o estudo.

## 3.2 PROCEDIMENTOS

### 3.2.1 Preparo de soluções padrão

#### 3.2.1.1 *Solução padrão estoque*

A solução padrão estoque utilizada para a avaliação de todos os métodos foi a mesma Albumina de Soro Bovino (BSA) descrita na seção 3.1.1.

A cada batelada de amostras analisadas as ampolas foram abertas somente após atingirem a temperatura ambiente, no momento da utilização e não foram reutilizadas após abertas.

#### 3.2.1.2 *Solução padrão de trabalho a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solvente ou matriz*

Um volume de 500  $\mu\text{L}$  da solução padrão estoque foi diluído em solvente (água ultrapura tipo 1 ou hidróxido de sódio 0,1 mol/L ou solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L contendo 2% de SDS) ou em matriz PRP para um volume final de 20 mL em balão calibrado. A solução foi preparada no momento do uso.

#### 3.2.1.3 *Solução padrão de trabalho a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solvente ou matriz*

Um volume de 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão estoque foi diluída em solvente (água ultrapura tipo 1 ou hidróxido de sódio 0,1 mol/L ou solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L contendo 2% de SDS) ou em matriz PRP para um volume final de 20 mL em balão calibrado. A solução foi preparada no momento do uso.

#### 3.2.1.4 *Solução padrão de trabalho a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em solvente ou matriz*

Um volume de 2 mL da solução padrão de trabalho a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (seção 3.2.1.3) foi diluída em solvente (água ultrapura tipo 1 ou hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ou solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo 2% de SDS) ou em matriz PRP para um volume final de 20 mL em balão calibrado. A solução foi preparada no momento do uso.

### 3.2.2 Preparo das amostras

#### 3.2.2.1 Amostras brancas de reagentes

Amostras brancas de reagentes foram preparadas utilizando água ultrapura tipo 1, hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ou SDS 2% em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  como substituto da amostra branca (sem o analito alvo), pipetando-se o volume do solvente equivalente ao volume final utilizado no método e em seguida dando prosseguimento ao procedimento conforme descrito na seção 3.2.3.

#### 3.2.2.2 Amostras brancas de PRP

Amostras de 100 mg de PRP foram pesadas em balança analítica com resolução de 0,1 mg. As amostras foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico calibrado de 10 mL e dissolvidas com água ultrapura tipo 1, com hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ou com solução hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo 2% de SDS, a fim de obter concentrações de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de PRP.

As amostras foram solubilizadas em água resfriada em torno de  $4^\circ\text{C}$ , homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 30 segundos e levadas à câmara fria em temperatura de  $2-8^\circ\text{C}$  por 1 hora. Após este período foram retiradas e mantidas em repouso até atingirem a temperatura ambiente, de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ . O volume foi completado com o solvente (água ultrapura tipo 1, solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol/L}$  ou solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol/L}$  contendo 2% de SDS), as amostras foram homogeneizadas novamente e levadas à câmara fria ( $2-8^\circ\text{C}$ ), onde permaneceram por mais 1 hora. Após retiradas da câmara fria foram homogeneizadas novamente em agitador de tubos tipo vórtex, por 10 segundos. Após atingirem a temperatura ambiente (aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ ) foram homogeneizadas novamente em agitador de tubos tipo vórtex, por 10 segundos, imediatamente antes de serem utilizadas para os ensaios.

### 3.2.2.3 Amostras de PRP fortificadas

Amostras brancas de PRP foram fortificadas com o analito alvo (BSA) no início do procedimento utilizando 2,0 mL da solução padrão de trabalho (seção 3.2.1.2) a fim de obter 20 mL de solução na concentração de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BSA. Outras amostras foram fortificadas em distintas concentrações empregadas nas curvas de calibração.

Após a adição do analito alvo, as amostras foram homogeneizadas utilizando o agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos e mantidas em repouso em câmara fria na temperatura de 2-8 °C por 1 hora.

Imediatamente antes da adição dos reagentes específicos de cada método, conforme descrito na seção 3.2.3, cada alíquota das amostras foi novamente homogeneizada em vórtex por 10 segundos antes de serem transferidas para os tubos de ensaio.

### 3.2.3 Diferentes métodos espectrofotométricos para a determinação de proteínas residuais em polissacarídeos de poliribosil ribitol fosfato

As amostras brancas de reagentes e brancas de PRP foram preparadas conforme as seções 3.2.2.1 e 3.2.2.2. Para o preparo das curvas de calibração de BSA em solventes foi utilizada a solução de trabalho de BSA a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (seção 3.2.1.2). Uma solução de trabalho de BSA a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  contendo 2% de SDS foi empregada também para a construção de uma curva de calibração no método de Smith (seção 3.2.3.3).

Foram feitas pequenas modificações nos métodos de Lowry, Peterson e Smith, conforme descrito a seguir.

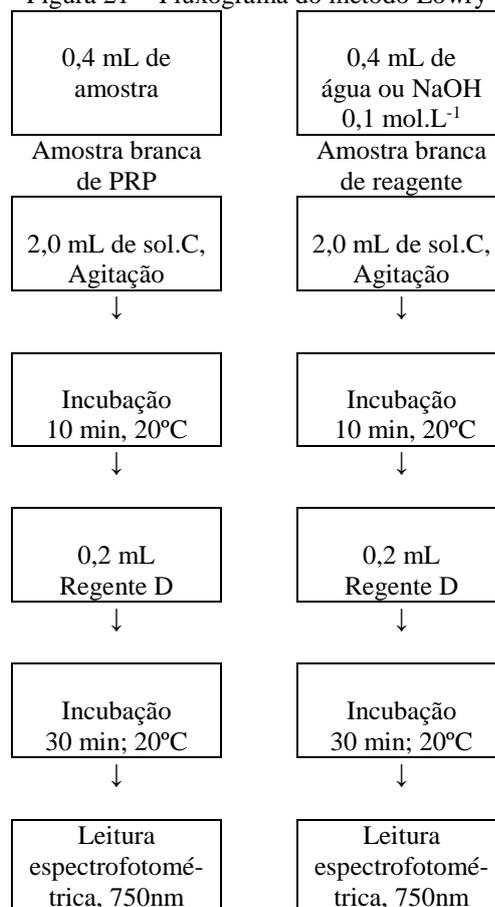
#### 3.2.3.1 Método Lowry

Todas as soluções foram preparadas em quantidade suficiente para o número de amostras no momento do uso. A solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol/L}$  foi preparada pesando-se 2,0 g do sal, dissolvendo-o em solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , para o volume de 100 mL. Para o preparo de 10 mL da solução de sulfato de cobre 1%, foram dissolvidos 0,1 g do sal em água ultrapura tipo 1; a solução de tartarato de sódio e potássio 2% foi preparada com 0,2 g do sal, dissolvido em 10 mL água ultrapura tipo 1; a solução de cobre-tartarato-carbonato (solução C) contendo 2% de carbonato de sódio, 0,01% de sulfato de cobre e 0,02% de tartarato de potássio em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

foi preparada com 1,0 mL da solução de sulfato de cobre 1%; 1,0 mL da solução de tartarato de sódio e potássio 2% e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  para 100mL e o reagente de fenol Folin-Ciocalteau 1:1 (reagente D) foi preparado diluindo-se 5,0 mL do reagente de fenol Folin-Ciocalteau 2 N em 5,0 mL de água ultrapura tipo 1.

As curvas de calibração de BSA em solvente com alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e 400  $\mu\text{L}$  foram preparadas em tubos de ensaio 10x100 mm, em triplicata de cada um dos níveis de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando a solução de trabalho de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (seção 3.2.1.2), e calculadas plotando-se a absorvância no eixo dos x e a concentração no eixo dos y. Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  das amostras brancas de reagente (seção 3.2.2.1) e branca de PRP (seção 3.2.2.2) de cada solução de BSA foram transferidas em triplicata para tubos de ensaio de vidro de 10 x 100 mm e processadas conforme o fluxograma da figura 17, perfazendo um volume final de 2600  $\mu\text{L}$ . As alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram processadas com a redução proporcional dos volumes, atingindo um volume final de 1300  $\mu\text{L}$ .

Figura 21 - Fluxograma do método Lowry



As amostras foram homogeneizadas utilizando agitador de tubos tipo vórtex, antes de cada transferência para os tubos. Pipetas automáticas *Eppendorf* de 100 e 1000  $\mu\text{L}$  foram usadas para transferência dos volumes.

### 3.2.3.2 Método Peterson (Método Lowry modificado)

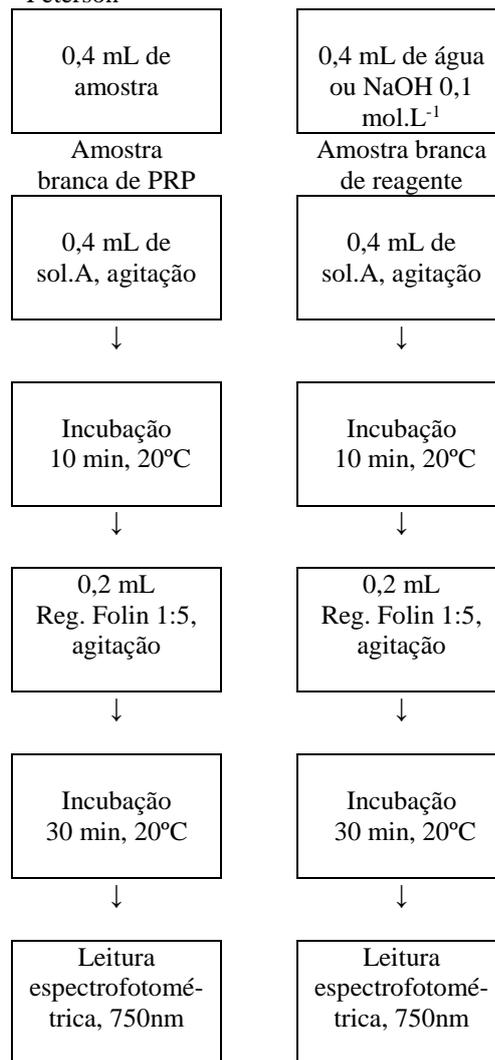
O procedimento foi realizado conforme descrito no trabalho de Peterson (PETERSON, 1983), conforme relatado no Capítulo 1.

O procedimento foi conduzido conforme o fluxograma da figura 18 e todas as soluções descritas a seguir foram preparados no momento da utilização. Os volumes foram medidos utilizando pipetas automáticas *Eppendorf* com ponteiros descartáveis.

Para o preparo de uma solução de cobre – tartarato – carbonato (CTC) contendo 10% de carbonato de sódio, 0,1% de sulfato de cobre penta hidratado e 0,2% de tartarato de potássio, foram utilizados 50 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% preparada com 10 g de carbonato de sódio dissolvidos em água ultrapura tipo 1, a seguir foram adicionados a esta solução 0,1 g de sulfato de cobre penta hidratado e 0,2 g de tartarato de sódio e potássio, diluídos em água ultrapura tipo 1, e então o volume foi completado com água ultrapura tipo 1 para 100 mL; 20 mL de uma solução de SDS a 5% foi preparada com 1,0 g de SDS dissolvido em água ultrapura tipo 1; a solução de hidróxido de sódio  $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$  foi preparada a partir da diluição de 8,0 mL da solução de hidróxido de sódio  $1 \text{ mol/L}$  (solução Merck) em 2 mL de água ultrapura tipo 1; a solução A foi preparada com 10 mL da solução CTC, 10 mL da solução de hidróxido de sódio  $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$  e 20 mL da solução de SDS 5% misturados em um frasco de polipropileno sob agitação, utilizando um agitador tipo vórtex e a solução 1:5 do reagente de Folin-Ciocalteu, (4 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluídos com 20 mL de água ultrapura tipo 1).

As curvas de calibração de BSA em solvente ou matriz com alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e 400  $\mu\text{L}$  foram preparadas em tubos de ensaio 10x100 mm, em triplicata em cada um dos níveis (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), utilizando a solução de trabalho de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (seção 3.2.1.2), e calculadas plotando-se a absorvância no eixo dos x e a concentração no eixo dos y. Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  das amostras brancas de reagente (seção 3.2.2.1) e brancas de PRP (seção 3.2.2.2) de cada solução de BSA foram transferidas em triplicata para tubos de ensaio de vidro de 5 x 70 mm e processadas conforme o fluxograma da figura 22, perfazendo um volume final de 1000  $\mu\text{L}$ . As alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram processadas com a redução proporcional dos volumes atingindo-se um volume final de 500  $\mu\text{L}$ .

Figura 22 - Fluxograma do método Peterson



### 3.2.3.3 Método Smith

O método de Smith, ensaio padrão (SMITH, 1985) foi executado utilizando o Kit *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (Sigma, Alemanha) adotando-se o procedimento padrão para teste em tubos e reagente de trabalho (RT) na razão de 1:20.

O reagente de trabalho (RT) foi preparado conforme as instruções do fabricante, misturando-se 50 partes do reagente A (solução de ácido bicinconínico) com 1 parte do reagente B (solução de sulfato de cobre). O preparo foi calculado para 2,0 mL por tubo, conforme o número de amostras e foi efetuado no momento do ensaio.

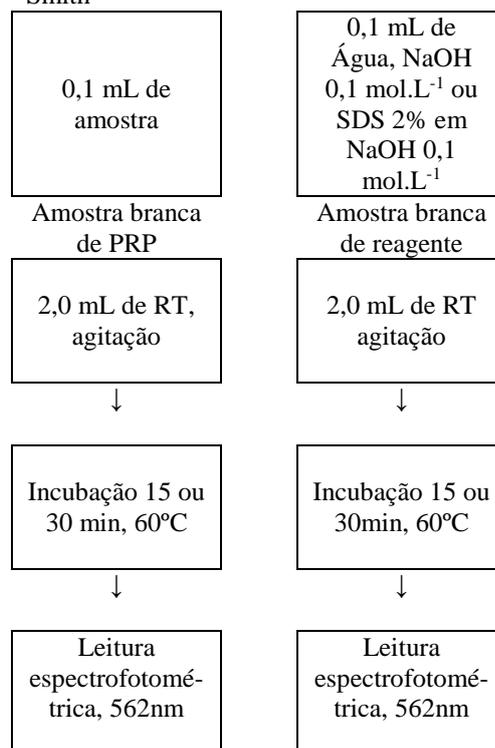
As curvas de calibração de BSA no solvente foram preparadas em duas etapas. Primeiramente foram preparados 600 µL dos padrões em tubos descartáveis de polipropileno com tampa (*eppendorf*), em triplicata, nos níveis de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 µg.mL<sup>-1</sup>

e também nos níveis de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando a solução de trabalho de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (seção 3.2.1.2). A seguir foram transferidas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  em triplicata de cada padrão para tubos de ensaio 10 x 100 mm com tampa.

Conforme fluxograma da figura 23 foram adicionados 2,0 mL do RT em cada tubo, perfazendo um volume total de 2100  $\mu\text{L}$ , seguido de agitação em vórtex. Os tubos foram tampados e utilizando-se banho térmico (ultratermostatizado) permaneceram incubados na temperatura de 60°C, em dois modos de análise: por 15 minutos (1) e por 30 minutos (2).

Como descrito por Brown, Jarvis e Hyland (1989), o método de Smith também foi executado utilizando-se como solvente, além da água e do hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , uma solução de hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  contendo 2% de SDS.

Figura 23 - Fluxograma do método de Smith



### 3.2.4 Avaliação da aplicabilidade do método proposto como substituto ao método usado em Bio-Manguinhos para a determinação de proteínas em polissacarídeos de PRP

O método que apresentou a melhor adequação às amostras, a maior sensibilidade e a melhor precisão dos resultados de quantificação de proteínas residuais do polissacarídeo

purificado de poliribosil-ribitol fosfato (PRP) foi escolhido como candidato a método substituto ao método Lowry usado em Bio-Manguinhos.

As modificações ao método em uso incluíram a eliminação da etapa de secagem prévia das amostras de PRP a 60°C, a solubilização das amostras a temperaturas inferiores a 20°C, o volume das alíquotas (400 µL), o intervalo dos níveis de concentração da curva de calibração para um intervalo de 2,5 a 15 µg.mL<sup>-1</sup> de BSA e a realização da homogeneização das amostras por 5 segundos no momento da execução do método, antes de transferir as alíquotas para os tubos de ensaio.

### 3.2.5 Avaliação da adequabilidade do método analítico selecionado

O método proposto para a determinação de proteínas residuais totais do PRP foi avaliado no Laboratório de Controle Físico-Químico (LAFIQ) e comparado com o método Lowry. O preparo das amostras de cada lote em estudo foi efetuado conforme descrito na seção 3.2.2. Porções de 30, 50 e 100 mg das amostras em estudo foram pesadas em balança analítica, acondicionadas em vials descartáveis de vidro ou polipropileno e conservadas em câmara fria, de 2-8°C, durante o período de estudo.

Os parâmetros avaliados foram intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental), seletividade, efeito matriz, linearidade (intervalo linear do método), repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação. As avaliações do método foram conduzidas segundo instruções em publicações oficiais para procedimentos de validações específicas (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2003a; BRASIL, 2010) e genéricas (INMETRO, 2011).

#### 3.2.5.1 Intervalo de medição e intervalo linear (função de calibração instrumental)

A faixa regulatória exigida para o teor de proteínas residuais nos polissacarídeos de Hib (PRP) é de no máximo 1%, calculada sobre a massa seca (FARMACOPÉIA Europeia, 2011; WHO, 2000).

Para efeito de comparação com o método Lowry usado para quantificação de proteínas totais do PRP, foram preparadas curvas de calibração nas concentrações de até 150% da concentração mais esperada das amostras, a fim de atender às recomendações para validação de métodos analíticos. As concentrações do analito alvo foram 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15 µg.mL<sup>-1</sup>, equivalentes a 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,125 e 0,150 vezes o valor de referência de

100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (1%) com o objetivo de situar a concentração mais esperada das amostras o mais próximo possível no centro do intervalo de trabalho (INMETRO, 2011).

A avaliação do intervalo de medição e do intervalo linear foi efetuada pela construção de curvas de calibração com seis níveis de concentração, com adição do padrão de trabalho ao solvente de reconstituição preparado conforme as seções 3.2.3.1; 3.2.3.2.

As soluções padrão foram determinadas espectrofotometricamente em triplicata. A análise estatística dos dados foi efetuada, iniciando-se pela avaliação da presença de valores aberrantes em cada conjunto de repetições em cada nível de concentração, empregando-se o teste de Grubbs a  $\alpha=0,05$  e supondo-se que os dados são provenientes de uma distribuição normal e a avaliação da homogeneidade das variâncias dos dados das curvas de calibração foi realizada pelo teste de Cochran (INMETRO, 2013).

#### 3.2.5.2 Seletividade

A seletividade para o método selecionado foi avaliada pela análise de amostras dos três lotes em estudo. Para verificação da seletividade foram realizados os procedimentos descritos nas seções 3.2.3.1 e 3.2.3.2, na concentração de 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de amostras fortificadas *versus* padrão de BSA em solvente água ultrapura tipo 1.

#### 3.2.5.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi estudado comparando-se as variâncias das leituras de seis replicatas das referências (BSA padrão) e seis replicatas das amostras de PRP fortificadas com analito (BSA) na concentração de 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (seção 3.2.2.3), conforme os procedimentos descritos nas seções 3.2.3.1 e 3.2.3.2.

Para cada amostra o fator de matriz foi calculado, conforme a fórmula  $FM = \text{resposta do analito em matriz/resposta do analito em solução}$ . O critério estabelecido pela Anvisa estabelece que o coeficiente de variação (CV) do FM relativo à cada amostra seja inferior a 15% (BRASIL 2012a), também foram aplicados o teste de Cochran, o teste F e o teste T conforme descrito pelo INMETRO (2013), utilizando o programa Excell.

#### 3.2.5.4 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade

A avaliação da linearidade e sensibilidade do método foi efetuada pela análise estatística das curvas de calibração do analito obtidas em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de trabalho de 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 3.2.5.5 Precisão (Repetibilidade)

Os três lotes experimentais de PRP foram analisados para verificação da repetibilidade. O método foi executado pelo mesmo operador, no mesmo dia, realizando os ensaios logo após a dissolução das amostras utilizando alíquotas de 400  $\mu\text{L}$ , conforme as seções 3.2.3.1; 3.2.3.2.

Foi preparado também um branco de reagentes conforme a seção 3.2.2.1 e utilizou-se seis alíquotas genuínas dos três lotes de PRP em estudo, na mesma concentração usada na rotina de análises (10  $\text{mg/mL}$ ), conforme a seção 3.2.2.2, mas pesando-se 50 mg de cada lote.

O procedimento foi repetido três vezes pelo mesmo operador com as seis alíquotas das amostras.

Para quantificar as amostras foram construídas curvas de calibração com seis níveis de concentração equivalentes a 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,125 e 0,150 vezes o limite máximo especificado (LME), ou seja 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , incluindo o nível de impureza mais esperado próximo à região central da curva.

Para a avaliação foram calculados os coeficientes de variação CV (%) das concentrações da primeira leitura de cada amostra, pela fórmula:

$$\text{CV (\%)} = s / \bar{x} (100) \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

$\bar{x}$  = média das concentrações

s = desvio padrão das concentrações calculadas para as leituras

#### 3.2.5.6 Limite de detecção (LD)

A partir dos dados da curva de calibração considerou-se como limite de detecção o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração contendo concentrações

do analito no limite de concentração especificado para a impureza. Os valores dos limites de detecção foram verificados experimentalmente.

#### 3.2.5.7 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método foi calculado considerando-se o desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração contendo concentrações do analito no intervalo de concentração especificado para a impureza até a menor concentração do analito que foi determinado com precisão e exatidão adequadas.

#### 3.2.5.8 Exatidão (Recuperação)

Para verificação da exatidão foram realizados os procedimentos descritos nas seções 3.2.3.1 e 3.2.3.2. A recuperação foi calculada pela análise estatística da diferença entre as médias dos valores obtidos em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de trabalho de 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , comparando-se com o valor teórico do analito (BSA).

### 3.2.6 Aplicação do método analítico selecionado para a análise de amostras de PRP

Partes das mesmas amostras dos três lotes experimentais de PRP utilizadas nos estudos de avaliação da adequabilidade do método analítico selecionado foram analisadas com o método avaliado que demonstrou melhor desempenho.

#### 3.2.6.1 Preparo das amostras

As amostras de PRP foram preparadas conforme descrito na seção 3.2.2.

#### 3.2.6.2 Preparo da curva de calibração

Para quantificar as amostras foram construídas curvas de calibração de BSA no solvente e na matriz no intervalo de 1 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), conforme descrito nas sessões 3.2.2.1; 3.2.2.2 e 3.2.3.2.

#### 3.2.6.3 Quantificação

Para obter o teor de proteína residual nas amostras de PRP, dividiu-se a concentração obtida da curva de calibração pela concentração da amostra de PRP, utilizando a equação 6.

$$\text{Proteína residual (\%)} = \frac{\text{concentração de proteína obtida da curva de calibração (\mu\text{g/mL})}{\text{concentração da amostra (\mu\text{g do polissacarídeo seco /mL})}$$

(Equação 6)

A fim de confirmar a ausência do efeito de matriz e os valores calculados de proteína residual para as amostras de PRP, comparou-se as soluções de PRP fortificadas a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com a referência de BSA em solvente na mesma concentração preparadas conforme a seção 3.2.1.4 e para quantificação foram construídas curvas de calibração em solvente e na matriz.

Obteve-se as concentrações de proteínas residuais na base seca, nas amostras de PRP fortificadas, pela subtração dos valores das médias das concentrações das amostras brancas de PRP fortificadas a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , das médias dos valores das concentrações das referências do padrão de BSA a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , obtidas das curvas de calibração e multiplicou-se pelo fator 100, dividindo-se pela massa seca, conforme a equação 7.

$$\text{Proteína residual (\%)} = (\text{Br}_{\text{PRP(fort)}} - \text{Ref}_{\text{BSA}} / m_{\text{amostra}}) \times 100$$

(Equação 7)

Onde,

Proteína residual (%) = Concentração percentual de proteínas residuais das amostras de PRP na base seca.

$\text{Br}_{\text{PRP(fort)}}$  = Média das determinações da concentração das amostras brancas de PRP fortificadas a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

$\text{Ref}_{\text{BSA}}$  = Média das determinações do padrão de referência de BSA a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$

$m_{\text{amostra}}$  = Massa seca ( $\mu\text{g}$ ) da amostra de PRP (determinação indireta, conforme descrito na seção 3.2.2).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos efetuados e descritos nesta dissertação de mestrado relacionados tanto ao método de Folin-Lowry modificado por Peterson (1983) como ao método do ácido bicinconínico (SMITH et al, 1985), foram considerados adequados após uma de avaliação preliminar e tiveram a finalidade de melhorar o ensaio de quantificação da proteína residual na amostra polirribosil ribitol fosfato (PRP) no LAFIQ de Bio-Manguinhos, feita pelo método clássico de Folin-Lowry (FARMACOPEIA Européia, 2011; LOWRY et al, 1951).

Neste sentido, foram implementadas modificações primeiramente relacionadas à solubilização da amostra do polissacarídeo; em seguida, pelos métodos relacionados acima e procurou-se atender às recomendações para intervalo de trabalho e intervalo linear (INMETRO, 2011) para a quantificação de impurezas, no caso específico, proteína residual, no limite regulatório preconizado pela WHO (2000) e Farmacopeia Europeia (2011).

### 4.1 ESTUDO DE SOLUBILIZAÇÃO DA AMOSTRA

O procedimento de solubilização da amostra de PRP tradicionalmente feita após tratamento térmico das amostras de PRP à 60°C em água ultrapura, sem agitação à temperatura ambiente (20°C), seguida de incubação a frio (2-8°C), durante 24 h., tem por objetivo evitar a formação de espuma. Foram efetuadas duas modificações visando diminuir o tempo de solubilização das amostras em estudo, a saber: modificação dos solventes e modificação da temperatura.

As condições de preparo das amostras foram modificadas a fim de minimizar os erros nos resultados, vistos que na metodologia adotada em Bio-Manguinhos para determinação de proteína pelo método de Folin-Lowry tomado como base para o desenvolvimento deste trabalho (FARMACOPEIA Européia, 2011; LOWRY et al, 1951), não está explícita a temperatura adequada para o preparo das amostras. Em geral utiliza-se a mesma amostra para vários ensaios, inclusive do teor de proteínas, após a secagem das amostras à 60°C, etapa necessária para conhecer o teor de umidade. No entanto, conforme demonstrado pelo estudo WHO (2014), a exposição do PRP à temperaturas acima de 37°C, pode promover condições de degradação e gerar possíveis interferentes no método de quantificação, em face disto, em todos os experimentos aqui propostos, as amostras não foram submetidas ao tratamento térmico mencionado.

A solubilização das amostras em água resfriada por volta de 4°C, em detrimento à água na temperatura ambiente (em torno de 20°C), permitiu o uso de agitação (vórtex), sem formação de espuma superficial, e a utilização imediata da preparação do polissacarídeo para a quantificação da proteína residual, reproduziu tanto quanto possível as condições de armazenamento requeridas para manutenção da integridade das amostras (seção 1.8) e assim, observou-se que com o procedimento de solubilização aqui proposto, o PRP apresentou melhor solubilidade, em comparação com as amostras submetidas a 60°C e dissolvidas em água à temperatura ambiente.

A modificação do solvente, foi para verificar a possível redução no tempo de solubilização das amostras, mantendo-se a temperatura ambiente para solubilização, em torno de 20°C. A escolha dos solventes hidróxido de sódio 0,1 mol/L e solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L contendo 2% de SDS, foram devidos à compatibilidade com os reagentes empregados nos três métodos em estudo. Com a modificação dos solventes, aparentemente as amostras apresentaram imediata solubilização, porém esta modificação não promoveu vantagens em relação ao uso da água como solvente (figuras 24, 25 e 26).

O método de Lowry demonstrou-se indiferente às modificações propostas, não houve mudanças significativas nas curvas de calibração (figura 24). A utilização do hidróxido de sódio como solvente interferiu pouco na sensibilidade deste método provavelmente devido às baixas concentrações dos reagentes, a solubilidade não foi prejudicada e por isto a variação da sensibilidade foi pouco evidenciada. Isto é coerente com a observação de Lowry et al (1951), de que neste método, o aumento da concentração de hidróxido de sódio não interfere na reatividade com o íon  $\text{Cu}^{2+}$ .

Segundo Brady e Humiston (1986), o princípio da teoria das colisões, estabelece que para uma reação química ocorrer, as moléculas dos reagentes devem colidir umas com as outras, o que nos permite explicar a relação entre a variação da solubilidade do meio reacional com a reatividade. Portanto, a diminuição da sensibilidade do método de Peterson com o uso do solvente hidróxido de sódio 0,1N (Figura 25), é coerente com a teoria das colisões e com a conclusão de Peterson (1977), de que nas concentrações ótimas dos constituintes, o SDS não interfere na reatividade do ensaio

Figura 24 – Método Lowry, com volume final de 1300  $\mu\text{L}$ . Variação dos solventes: água ultrapura tipo 1 ( $\diamond$ ); hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ( $\blacklozenge$ ).

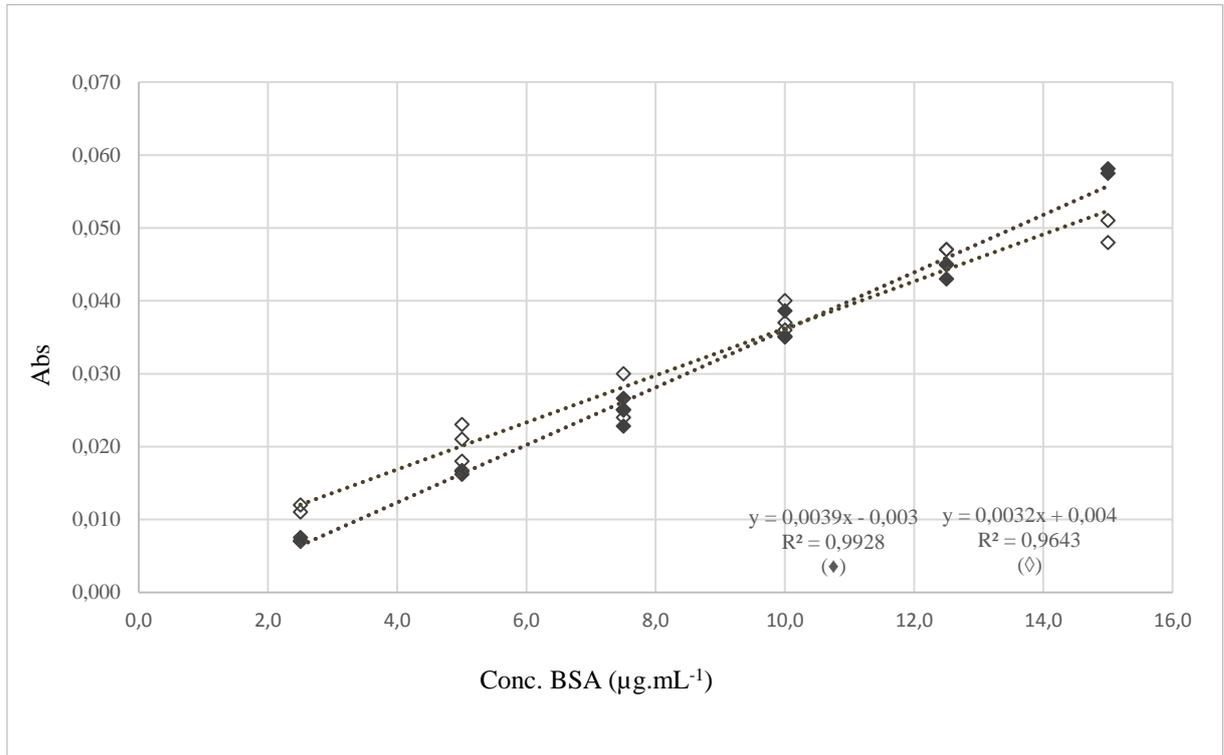
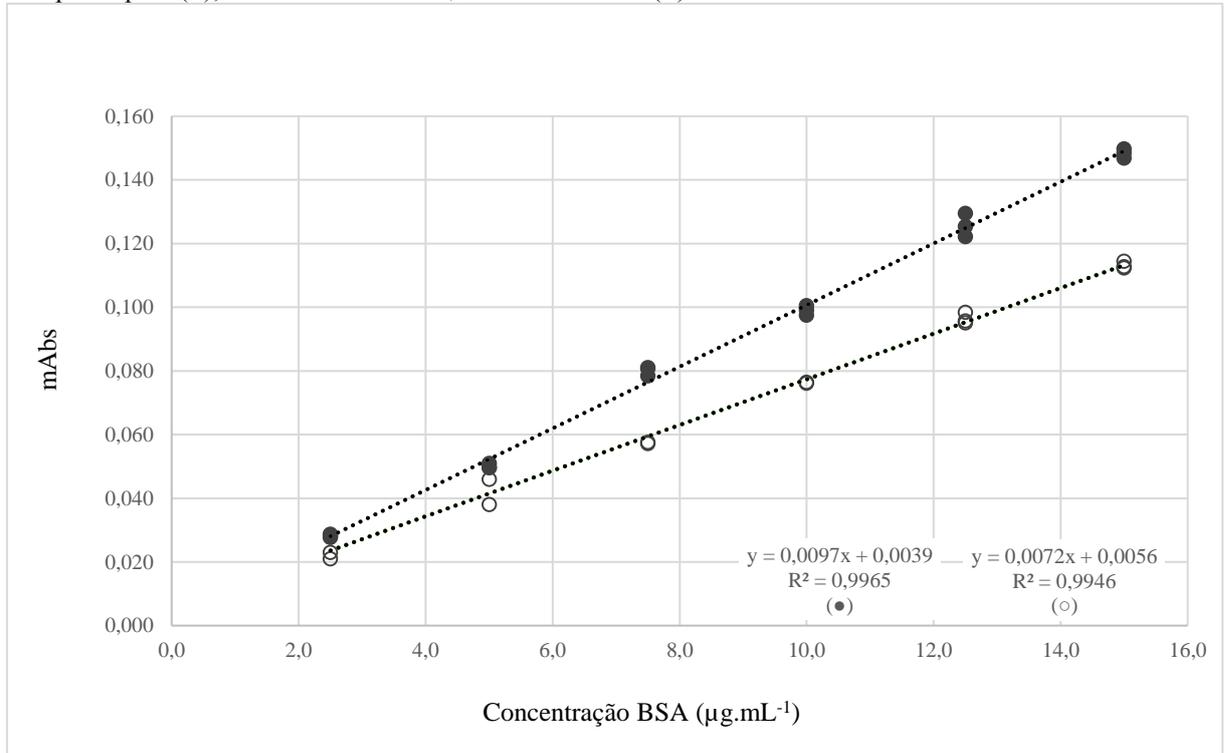
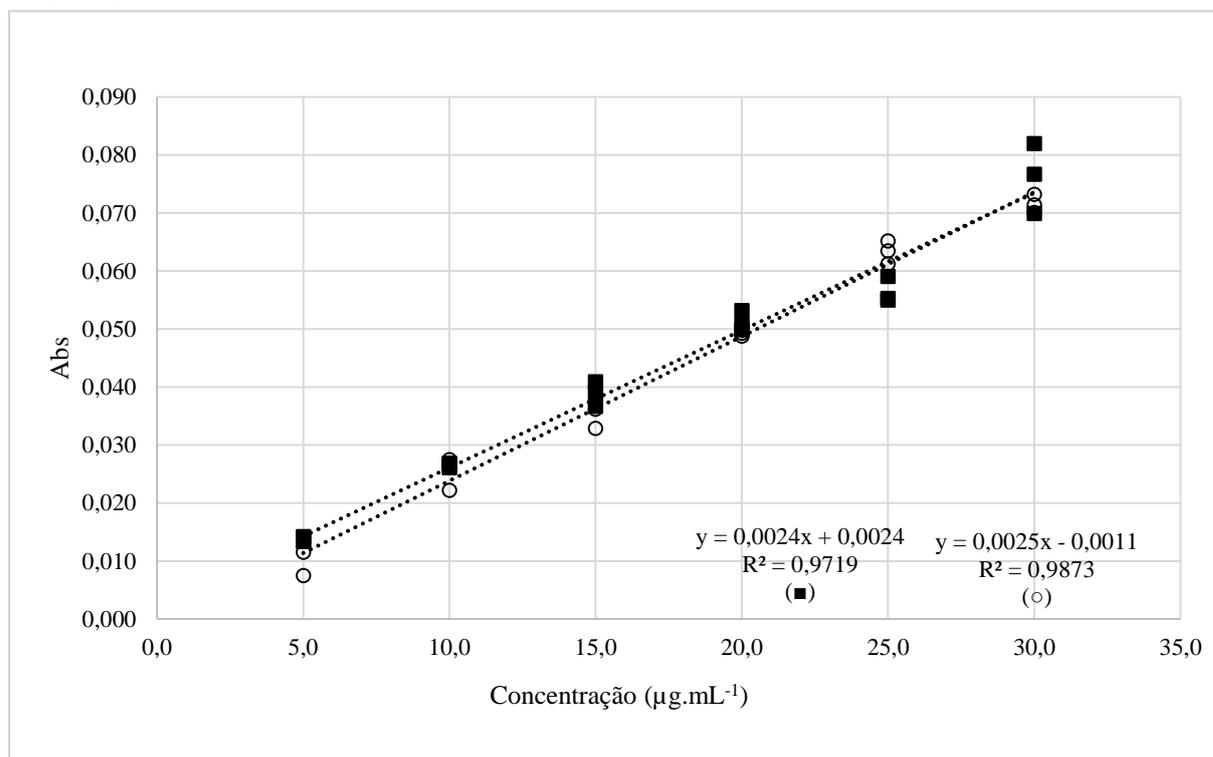


Figura 25 - Método de Peterson, com volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Variação dos solventes e dias dos ensaios: água ultrapura tipo 1 ( $\bullet$ ); hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> no dia 2 ( $\circ$ ).



A figura 26 mostra que não houve variação significativa no perfil da curva de calibração em relação aos dois solventes para o método de Smith. O aumento da concentração de hidróxido de sódio não interfere na reação com BCA.

Figura 26 - Método Smith. Variação dos solventes: hidróxido de sódio 0,1 mol/L 60°C / 15 min. (■); água ultrapura tipo 1 60°C / 15 min. (○).



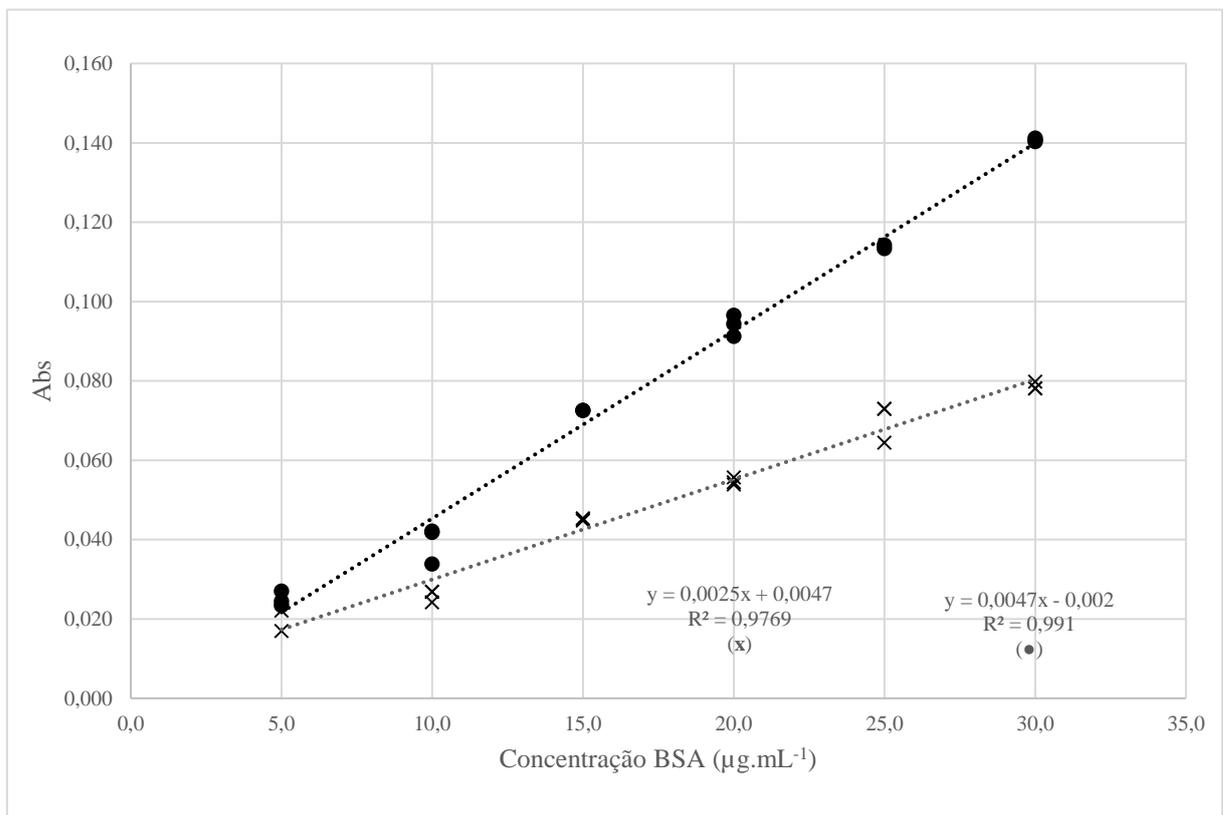
A redução da sensibilidade no método de Peterson com o uso do solvente hidróxido de sódio 0,1N, observada pela diminuição na inclinação da curva de calibração (figura 25), provavelmente está relacionada com a redução da solubilidade, provocada pelo desequilíbrio entre as concentrações de hidróxido de sódio e SDS e pelo aumento da concentração global diminuiu a mobilidade no meio reacional. Isto é coerente com a conclusão de Peterson (1977), de que nas concentrações ótimas dos constituintes, o SDS não interfere na reatividade do ensaio

Com o método de Smith, a adição de 2% de SDS ao solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> diminuiu muito a sensibilidade, como apresentado na figura 26, provavelmente devido à desnaturação das proteínas e à natureza dos reagentes envolvidos. A adição o SDS ao meio reacional dificultou ainda mais a aproximação das moléculas de BCA aos íons Cu<sup>+</sup>, a despeito do aumento da solubilidade, pois tanto o BCA (figura 13), quanto o SDS são moléculas muito maiores que os reagentes envolvidos nos outros métodos citados.

Quanto ao método de Peterson, ocorre o oposto devido à natureza dos reagentes envolvidos que por serem íons pequenos, não interferem na aproximação com o íon  $\text{Cu}^+$ . Por isto a presença de SDS aumenta a solubilidade contribuindo para a formação do cromóforo. Isto é coerente com o fato dos métodos de Lowry e Peterson serem citados como os mais adequados para quantificação de proteínas totais, devido à baixa variabilidade entre diferentes proteínas (PETERSON, 1979; ZAIA, 1998), enquanto os métodos de Smith e o de Bradford tem preferência por determinados aminoácidos (SMITH et al, 1985; OLSON; MARKWELL, 2007).

O comportamento do BCA em relação à presença de SDS demonstra coerência com o fato do método aumentar a velocidade da reação com a incubação à  $60^\circ\text{C}$ , pois conforme Brady e Humiston (1986), geralmente o aumento da temperatura aumenta a reatividade por favorecer a colisão das moléculas em solução.

Figura 27 - Método Smith ( $60^\circ\text{C}$  /30 min). Variação dos solventes,: hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  no dia 1 (●); Solvente hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  contendo 2% de SDS, no dia 2 (x).



Embora a sensibilidade expressa pela medida das absorvâncias nas concentrações mais baixas de BSA ( $5$  a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) tenham sido um pouco mais altas utilizando hidróxido de

sódio 0,1N, em comparação às medidas utilizando água como solvente, observa-se nas curvas de calibração obtidas para os três métodos que, com o aumento da concentração de BSA (20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em diante) a dispersão é maior com a utilização de hidróxido de sódio do que com o uso da água. Provavelmente isto ocorre devido à natureza das moléculas envolvidas.

Além disto, os coeficientes de regressão para a maioria das curvas de calibração obtidas com a utilização de solvente água ultrapura tipo 1 comprovam a superioridade desse solvente em relação ao hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para a solubilização das amostras. Obviamente o solvente água foi a escolha.

#### 4.2 ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS USADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NO PRODUTO VACINAL PRP (POLIRIBOSIL RIBITOL FOSFATO)

Segundo Peterson (1983), visto ser impraticável para a maioria dos laboratórios estimar a quantidade absoluta de proteínas totais com quantidades conhecidas da mesma proteína ou com um procedimento tal como análise de aminoácidos, a detecção e a quantificação de proteínas totais aplicáveis à rotina dos laboratórios de controle de qualidade geralmente são realizadas por métodos espectrofotométricos, que se baseiam nas propriedades de absorção de luz dos cromóforos resultantes de reações com as proteínas.

O método descrito para determinação de proteína pelo método Lowry (FARMACOPEIA Européia, 2011; LOWRY et al, 1951), foi tomado como base para o desenvolvimento deste trabalho.

Conforme descrito nas patentes industriais para produção de vacinas contra Hib (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS, 1999) ou outras tais como a descrita por American Cyanamid Company (1980) e Uclaf e Brossard et al (1980), todo o processo de fabricação das vacinas conjugadas de *H. Influenzae* b de Bio-Manguinhos é conduzido à temperatura em torno de 4°C. a partir da produção dos polissacarídeos purificados de Hib, que envolve várias fases, desde a fermentação de células, até as etapas de purificação, os principais contaminantes, tais como ácidos nucleicos, proteínas e endotoxinas são removidos seletivamente por processo cromatográfico, seguido de ultrafiltração, diálise e liofilização, obtendo-se um produto de alto peso molecular, significativa atividade imunogênica e baixo teor de contaminantes. A avaliação da pureza do produto é monitorada pela quantificação destes contaminantes em várias fases do processo e no produto final.

Portanto, a modificação na temperatura solubilização das amostras foi adequada para evitar as condições de degradação (WHO, 2014) visto o acentuado decréscimo do conteúdo de PRP, à temperatura de 56°C (seção 1.8), assim como a decisão de dispensar o tratamento prévio das amostras para remoção dos possíveis interferentes, desde que mantidas as condições de integridade do PRP (CRISEL, 1975; NELSON; COX, 2002). Portanto, as condições do processo de purificação do PRP e a metodologia aqui proposta para quantificação das proteínas, não evidenciam condições de interferência nos resultados.

#### 4.2.1 Método Lowry

O método de Folin-Lowry utilizado para a determinação de proteínas residuais no produto vacinal PRP em Bio-Manguinhos segue as recomendações internacionais (WHO, 2000; Farmacopéia Européia, 2011) e utiliza alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e curva de calibração no intervalo de 2,5 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,5; 6,25; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Apesar de muito sensível e apresentar baixa variação de absorvidade específica para diversas proteínas, o método de Lowry et al (1951), apresentou leituras de absorvância muito baixas e coeficientes de variação altos no intervalo alvo deste estudo (2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), tanto para os padrões quanto para amostras submetidas ou não à secagem prévia à 60°C.

Tabela 1 - Curva de calibração de BSA em solvente, do método de Lowry (0,025 a 0,50 LME), metodologia usada em Bio-Manguinhos.

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Padrão BSA 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Solvente ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )
0	0	200	200
2,5	10	190	200
6,25	25	175	200
12,5	50	150	200
25,0	100	100	200
37,5	150	50	200
50,0	200	0	200

A curva de calibração de BSA em solvente com alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada um dos níveis 2,5; 6,25; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi preparada conforme descrito na tabela 1.

Os dados obtidos da curva de calibração no solvente água ultrapura tipo 1 pelo método Lowry estão apresentados na tabela 2. A figura 28 representa a curva de calibração construída com os dados da tabela 2.

Foram calculadas as médias das concentrações, os coeficientes de variação e o intervalo de confiança das concentrações calculadas de proteínas das amostras de PRP, submetidas à temperatura de 60°C/60 minutos, solubilizadas em solvente água ultrapura pelo método Lowry (método usado em Bio-Manguinhos) para dois dos três lotes em estudo, conforme as seções 3.2.2.2 e 3.2.3.1 e obteve-se os dados indicados na tabela 3.

Tabela 2 - Dados obtidos para o método Lowry pela metodologia usada em Bio-Manguinhos. Cálculo da curva de calibração por regressão linear simples.

Concentração BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Leituras (Abs)	Média (Abs)	Desvio Padrão (Abs)	Intervalo de confiança (Abs)	CV (%)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
2,50	0,008; 0,008; 0,011	0,009	0,0017	$\pm 1,96$	19,2		
6,25	0,019; 0,022; 0,022	0,021	0,0017	$\pm 1,96$	8,2		
12,50	0,045; 0,035; 0,034	0,038	0,0061	$\pm 6,88$	16,0	$y = 0,00313x + 0,0017$	0,9973
25,00	0,087; 0,085; 0,085	0,086	0,0016	$\pm 1,31$	1,3		
37,50	0,114; 0,123; 0,123	0,120	0,0052	$\pm 5,88$	4,3		
50,00	0,158; 0,153; 0,157	0,156	0,0026	$\pm 2,99$	1,7		

O método de Lowry foi repetido, com modificação no intervalo de concentrações da curva de calibração de 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para a determinação de proteína residual, a fim de que a concentração mais esperada da impureza (4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) estivesse em uma região mais central da curva de calibração, conforme recomendação do Inmetro (2011), para o estabelecimento do intervalo de trabalho, de forma a diminuir os erros e melhorar a quantificação. As curvas de calibração de BSA em solvente com alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e 400 de cada um dos níveis de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  está descrito na tabela 4.

Figura 28 - Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 2, para o método Lowry

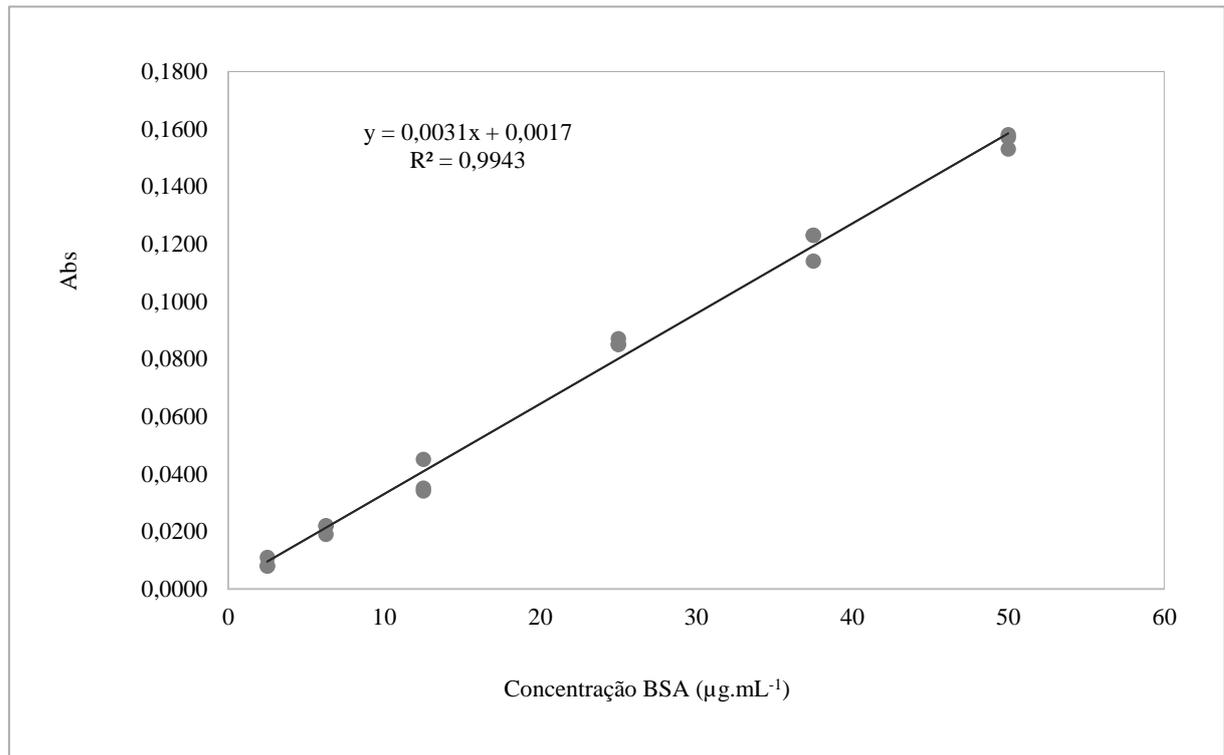


Tabela 3 - Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Lowry pela metodologia usada em Bio-Manguinhos (atual). Determinações espectrofotométricas realizadas logo após o preparo das amostras em solvente água.

Amostra	Leituras	Média das leituras	Concentração	Desvio Padrão	Intervalo de confiança	Concentração*	CV Concentração
PRP	(Abs)	(Abs)	(µg/mL)	(µg.mL <sup>-1</sup> )	(µg.mL <sup>-1</sup> )	(%)	(%)
Lote 1	0,0094; 0,0152; 0,0071; 0,0157; 0,0172; 0,0182	0,014	2,349	1,08004	±0,86	0,0216	76,63
Lote 3 **	0,0161; 0,0099; 0,0140; 0,0193; 0,0226	0,016	3,414	1,75225	±1,54	0,0305	51,46

Dados, sem exclusão de *outliers*, n = 6;  $\alpha = 0,95$ . A amostra do lote 2 foi perdida durante o ensaio de umidade residual; (\*) Calculada segundo a equação 6 (seção 3.2.6.3); (\*\*) n = 5

A figura 29 representa a curva de calibração construída com os dados da tabela 5.

Tabela 4 - Curva de calibração de BSA em solvente, dos métodos de Lowry e de Peterson (0,025 a 0,15 LME).

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Padrão BSA $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Solvente ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )
0	0	400	400
2,5	20	380	400
5,0	40	360	400
7,5	60	340	400
10,0	80	320	400
12,5	100	300	400
15,0	120	280	400

Tabela 5 - Dados obtidos para o método Lowry com alteração do intervalo de concentração para 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples.

Concentração BSA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Leituras (Abs)	Média das leituras (Abs)	Desvio padrão (Abs)	Intervalo de confiança (Abs)	CV (%)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
2,5	0,0090; 0,0109; 0,0118	0,010	0,0014	$\pm 0,0016$	13,5		
5,0	0,0171; 0,0190; 0,0189	0,018	0,0011	$\pm 0,0012$	5,8		
7,5	0,0279; 0,0267; 0,0298	0,028	0,0016	$\pm 0,0018$	5,6	$y = 0,0036x + 0,001$	0,9932
10,0*	0,0404; 0,0377	0,039	0,0019	$\pm 0,0022$	4,9		
12,5	0,0477; 0,0431; 0,0430	0,045	0,0027	$\pm 0,0030$	6,0		
15,0	0,0538; 0,0570; 0,0579	0,056	0,0022	$\pm 0,0024$	3,8		

$\alpha = 0,95$ ;  $n = 3$ ; (\*)  $n = 2$

Figura 29 - Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 5, para o método Lowry com alteração do intervalo de concentrações para 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e alíquotas de 400 $\mu\text{L}$ .

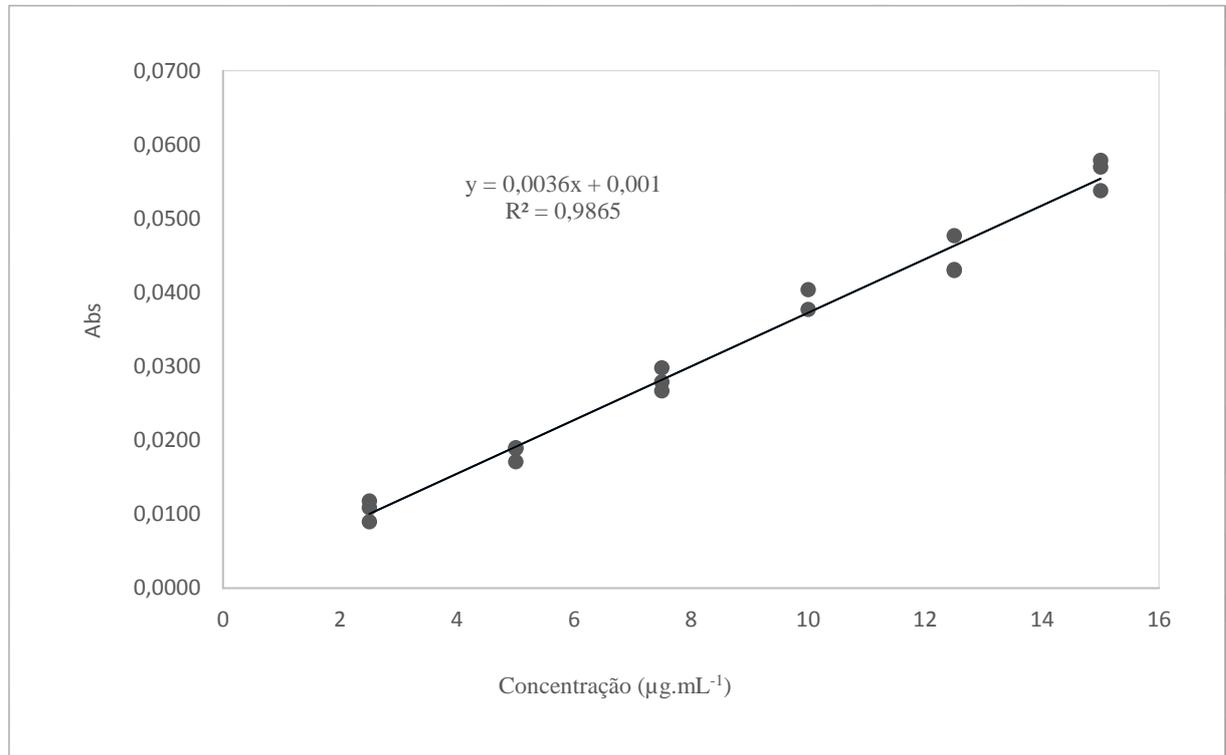


Tabela 6 - Quantificação de proteína residual nas amostras de PRP pelo método Lowry com modificação do intervalo de concentração para 2,5-15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As determinações espectrofotométricas foram realizadas logo após o preparo das amostras em solvente água.

Amostra	Leituras	Média das leituras	Concentração	Desvio Padrão	Intervalo de confiança	Concentração*	CV Concentração
PRP	(Abs)	(Abs)	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	(%)	(%)
Lote 1	0,0172; 0,0180; 0,0178; 0,0166; 0,0132; 0,0150	0,0163	4,140	0,53095	$\pm 0,425$	0,0421	12,82
Lote 2	0,0149; 0,0112; 0,0150; 0,0115; 0,0147; 0,0132	0,0134	3,318	0,49363	$\pm 0,395$	0,0353	14,88
Lote 3	0,0092; 0,0070; 0,0092; 0,0107; 0,0065; 0,0110	0,0089	2,040	0,5287	$\pm 0,423$	0,0214	25,91

Dados, sem exclusão de *outliers*,  $n = 6$ ;  $\alpha = 0,95$ .

(\*) Calculada segundo a equação 6 (seção 3.2.6.3)

Foram calculadas as médias das concentrações, os coeficientes de variação e o intervalo de confiança das concentrações calculadas de proteína nas amostras de PRP dos três diferentes lotes, preparadas em solvente água pelo método Lowry, conforme as seções 3.2.2.2 e 3.2.3.1 e obteve-se os dados indicados na tabela 6.

Visto que utilizando o intervalo mais amplo de 2,5 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,5; 6,25; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a curva demonstrou linearidade, o intervalo de 2,5 a 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) também é adequado às comparações entre os métodos em estudo.

#### 4.2.2 Método Peterson (método Lowry modificado)

A curva de calibração de BSA em solvente com alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  de cada um dos níveis 2,5; 6,25; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi preparada igualmente conforme descrito na tabela 4.

Os resultados obtidos para as amostras brancas de PRP fortificadas, preparadas conforme as seções 3.2.2.2 e 3.2.3.3, da curva de calibração no método de Peterson estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Dados obtidos para o método Peterson, com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples.

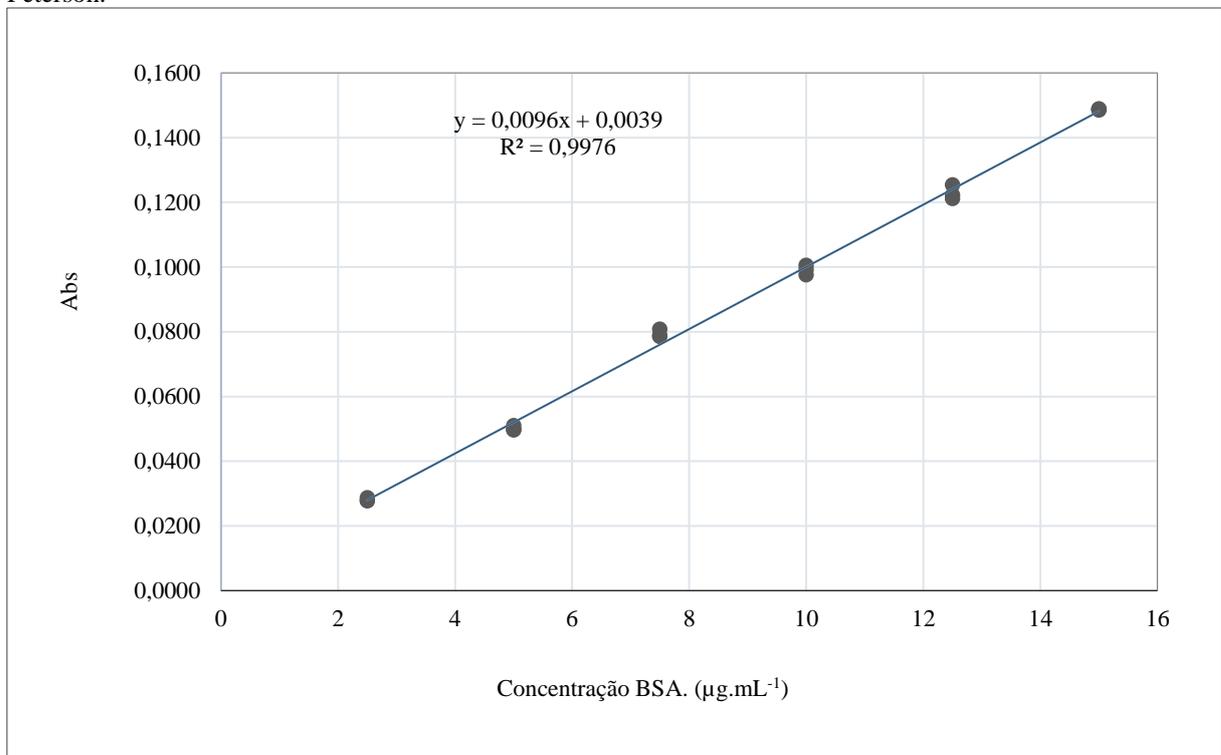
Concentração BSA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Leituras (Abs)	Média das leituras (Abs)	Desvio padrão (Abs)	Intervalo de confiança (Abs)	CV (%)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
2,50	0,0287; 0,0277; 0,0279	0,0287	0,0053	$\pm 0,0060$	1,9		
5,00	0,0498; 0,0496; 0,0510	0,0503	0,0076	$\pm 0,0086$	1,5		
7,50	0,0788; 0,0785; 0,0808	0,0794	0,0125	$\pm 0,0142$	1,6		
10,0	0,0975; 0,1005; 0,0991	0,0990	0,0150	$\pm 0,0170$	1,5	$y = 0,0096x + 0,0039$	0,9976
12,50	0,1222; 0,1211; 0,1254	0,1229	0,0223	$\pm 0,0253$	1,8		
15,00	0,1489; 0,1485; 0,1488	0,1484	0,0145	$\pm 0,0164$	0,4		

$\alpha = 0,95$ ;  $n = 3$

A figura 30 representa a curva de calibração para a quantificação de proteína residual do PRP, calculada com os dados da tabela 7.

Confrontando-se os resultados da tabela 2 (Lowry) com os da tabela 7 (Peterson), observou-se que para as mesmas concentrações do padrão de BSA, as leituras de absorvâncias foram maiores, com menores CVs, conseqüentemente, demonstrando a maior sensibilidade e precisão do método de Peterson, provavelmente devido à melhor solubilidade no meio reacional comentada na seção 4.1.

Figura 30 - Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 7, para o método Peterson.



Foram calculadas as médias das concentrações, os coeficientes de variação e o intervalo de confiança das concentrações calculadas de proteína nas amostras de PRP dos três diferentes lotes, preparadas em solvente água pelo método Peterson, conforme as seções 3.2.2.2 e 3.2.3.2 e obteve-se os dados indicados na tabela 8.

Tabela 8 - Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método Peterson. Determinações espectrofotométricas realizadas logo após o preparo das amostras em solvente água.

Amostras	Leituras	Médias	Concentração	Desvio padrão	Intervalo de confiança	Concentração *	CV Concentração
PRP	(Abs)	(Abs)	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	(%)	(%)
Lote 1	0,0453; 0,0475; 0,0416; 0,0455; 0,0430; 0,0448	0,0446	4,230	0,2134	$\pm 0,17$	0,0403	5,04
Lote 2	0,0468; 0,0415; 0,0447; 0,0465; 0,0444; 0,0448;	0,0448	4,250	0,1971	$\pm 0,16$	0,0413	4,64
Lote 3	0,0455; 0,0515; 0,0496; 0,0466; 0,0464; 0,0487	0,0481	4,590	0,2375	$\pm 0,19$	0,0442	5,17

n = 6;  $\alpha = 0,95$

(\*) Calculada segundo a equação 6 (seção 3.2.6.3).

#### 4.2.3 Método Smith

Para comparação com os métodos Lowry e Peterson foi necessário utilizar para este método (SMITH et al, 1985) uma curva com intervalo maior, de 5,0 a 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a fim de que a massa de BSA fosse igual para os três métodos em cada nível de concentrações, conforme demonstrado e discutido adiante na seção 4.2.4.

Tabela 9 - Curva de calibração de BSA em solvente do método Smith (0,05 a 0,3 LME)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Padrão BSA 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Solvente ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )
0	0	600	600
5	60	540	600
10	120	480	600
15	180	420	600
20	240	360	600
25	300	300	600
30	360	240	600

As curvas de calibração de BSA em solvente (água ultrapura tipo 1, solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e também com hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> contendo 2% de SDS), estão descritas nas tabelas 9 e 10.

Tabela 10 - Curva de calibração de BSA em solvente do método Smith (0,025 a 0,15 LME).

Concentração (µg/mL)	Padrão BSA 50 µg.mL <sup>-1</sup> (µL)	Solvente (µL)	Volume final (µL)
0	0	600	600
2,5	30	570	600
5,0	60	540	600
7,5	90	510	600
10,0	120	480	600
12,5	150	450	600
15,0	180	420	600

Tabela 11 – Dados obtidos para o método Smith, com cálculo da curva de calibração por regressão linear simples.

Concentração BSA (µg/mL)	Leituras (Abs)	Média das leituras (Abs)	Desvio padrão (Abs)	Intervalo de confiança (Abs)	CV (%)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
5,0	0,0154; 0,0136; 0,0126	0,0140	0,0013	±0,0015	9,2		
10,0	0,0225; 0,0225; 0,0255	0,0235	0,0017	±0,0020	7,4		
15,0	0,0385; 0,0362; 0,0364	0,0370	0,0020	±0,0022	5,6	y = 0,0021 x + 0,0034	0,9944
20,0	0,0475; 0,0449; 0,0431	0,0452	0,0023	±0,0026	5,0		
25,0	0,0578; 0,0581; 0,0546	0,0568	0,0032	±0,0022	3,4		
30,0	0,0688; 0,0630; 0,0635	0,0651	0,0016	±0,0036	4,9		

$\alpha = 0,95$ ; n = 3

Os dados obtidos com o procedimento padrão e incubação a 60°C por 15 min, conforme descrito na sessão 3.2.3.3.e utilizados para a construção da curva de calibração no solvente água ultrapura tipo 1 para o método de Smith estão apresentados na tabela 11.

Figura 31 - Curva de calibração, obtida por regressão linear simples, com os dados da tabela 13, para o método Smith.

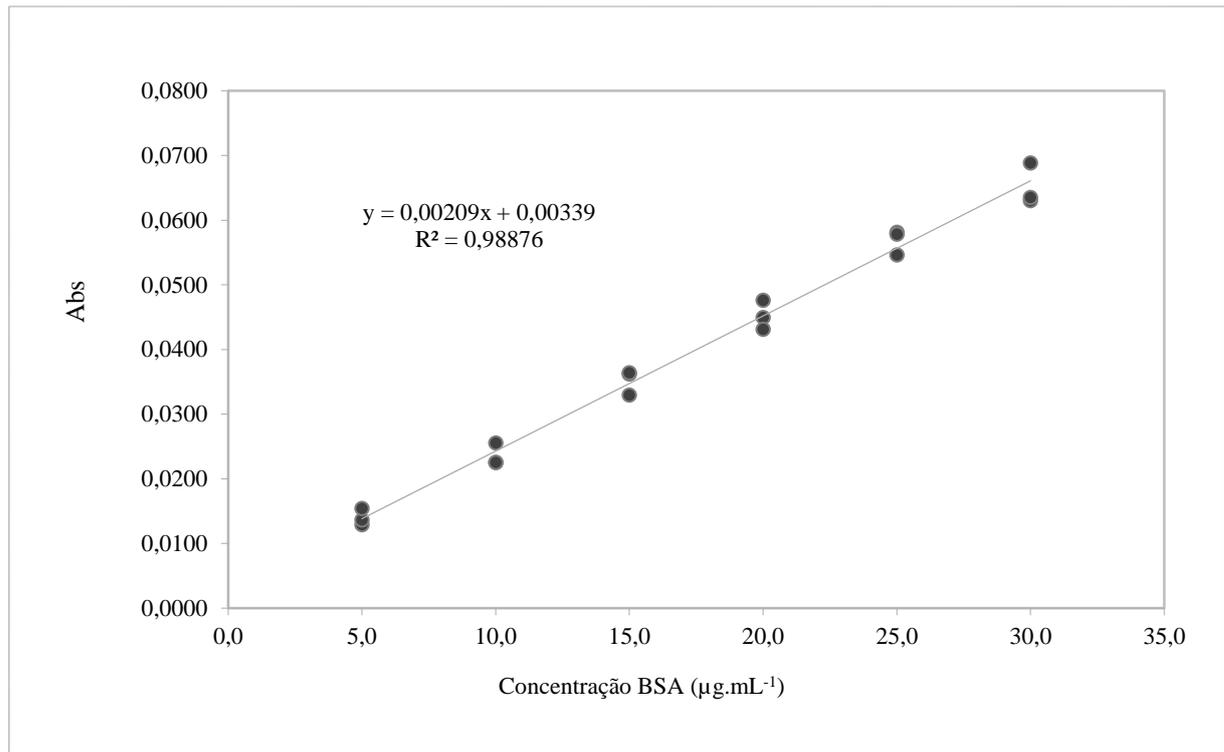


Tabela 12 - Quantificação de proteína residual das amostras de PRP pelo método de Smith. As determinações espectrofotométricas foram realizadas logo após o preparo das amostras em solvente água, com incubação a 60°C/15 min.

Amostras	Leituras	Médias	Concentração	Desvio padrão	Intervalo de confiança	Concentração *	CV Concentração
PRP	(Abs)	(Abs)	(µg.mL <sup>-1</sup> )	(µg.mL <sup>-1</sup> )	(µg/mL)	(%)	(%)
Lote 1**	0,0126; 0,0165; 0,0122; 0,0127; 0,0160	0,0140	5,363	0,9370	±0,75	0,0543	17,47
Lote 2**	0,0117; 0,0109; 0,0138; 0,0096; 0,0090	0,0124	4,178	0,8755	±0,70	0,0430	20,95
Lote 3	0,0102; 0,0253; 0,0199; 0,0092; 0,0123; 0,0146	0,0154	5,928	2,8184	±2,26	0,0620	47,54

n = 6; α = 0,95;

(\*) Cálculos segundo a equação 6 (seção 3.2.6.3);

(\*\*) Dados, com exclusão de 1 outlier (n = 5).

A figura 31 representa a curva de calibração para a quantificação de proteína residual do PRP, calculada com os dados da tabela 11.

Foram calculadas as médias das concentrações, os coeficientes de variação e o intervalo de confiança para as amostras de PRP dos três diferentes lotes, preparadas em solvente água pelo método de Smith, conforme as seções 3.2.2.2 e 3.2.3.3 e obteve-se os dados indicados na tabela 12.

#### 4.2.4 Sensibilidade inter-métodos

Pelos dados da tabela 7 pode-se perceber que além da maior precisão, as absorvâncias obtidas pelo método de Peterson para as mesmas amostras foram maiores que as obtidas pelo método Lowry (tabela 6).

Para comparar a relação concentração/resposta entre os três métodos em estudo, utilizou-se as mesmas quantidades de analito (massa de BSA) nos três métodos, relacionando as concentrações iniciais das alíquotas e os volumes finais dos ensaios.

Para os métodos Lowry e Peterson fixou-se a quantidade de massa (1,0 µg) simplesmente utilizando-se alíquotas de 400 µL. Para o método de Smith, cujo volume final é muito maior em comparação aos dois outros métodos, foi mantida a alíquota de 100 µL, variando-se a concentração inicial da solução, a fim de igualar as massas iniciais (1,0 µg).

A tabela 13 apresenta a quantidade de BSA esperada para o menor nível de concentração para os métodos de Folin-Lowry, Peterson e Smith.

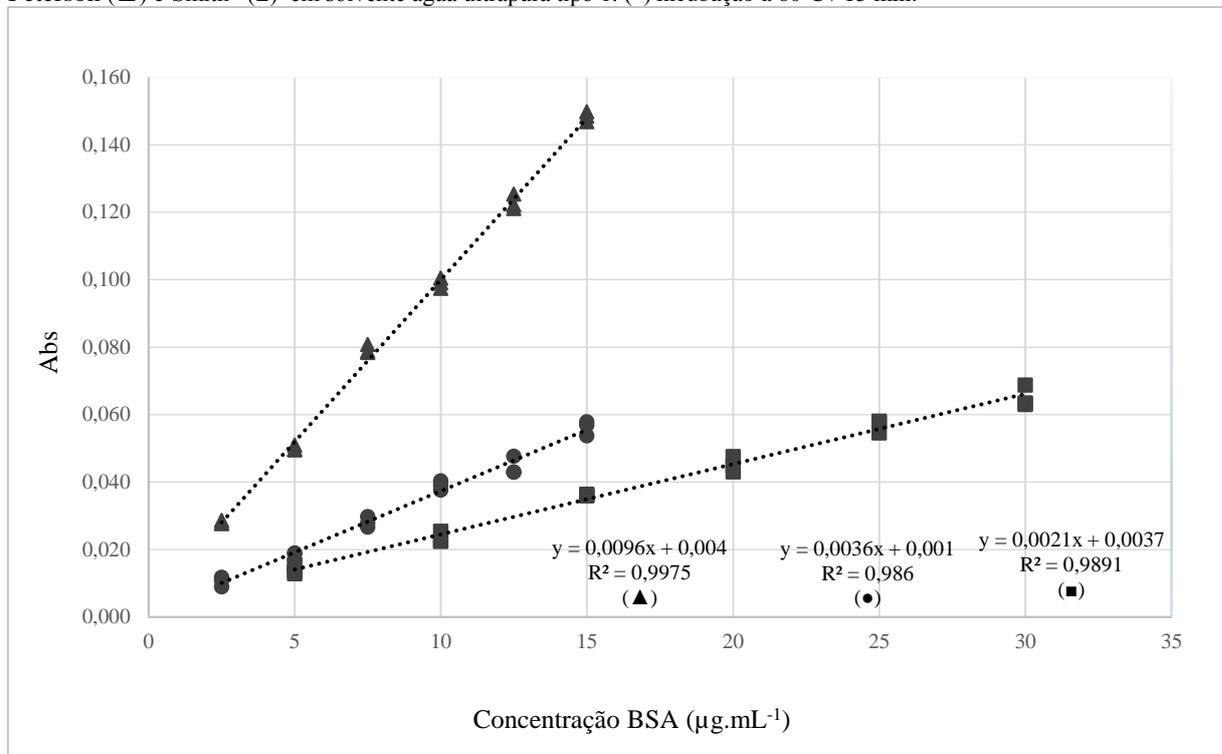
Tabela 13 - Quantidade de BSA esperada no menor nível de concentração para os métodos Lowry, Peterson e Smith.

Método	Alíquota (mL)	Concentração inicial (µg.mL <sup>-1</sup> )	Massa (µg)	Volume final (mL)	Concentração final (µg.mL <sup>-1</sup> )	Resposta (Abs)
Folin-Lowry	0,400	2,5	1,0	2,6	0,38	0,0106
Peterson	0,400	2,5	1,0	1,0	1,00	0,0281
Smith	0,100	10,0	1,0	2,1	0,48	0,0280

A partir do cálculo da quantidade de proteína esperada de BSA, foi possível comparar a sensibilidade entre os três métodos em estudo, expressa pela magnitude dos coeficientes angulares das curvas de calibração de cada um dos métodos, tanto com solvente água ultrapura tipo 1 (figura 32, quanto com o solvente hidróxido de sódio  $0,1\text{mol.L}^{-1}$  (figura 33).

Pela representação gráfica das curvas de calibração pode-se inequivocamente perceber a maior sensibilidade do método de Peterson em comparação com os métodos Smith e Lowry, tendo-se a mesma massa de analito (BSA) para os níveis de concentração de 2,5; 5,0; 10,0 e  $15,0\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura32).

Figura 32 - Relação concentração de BSA (Conc. BSA,  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) x resposta (Abs) dos métodos Lowry (●), Peterson (▲) e Smith\* (■) em solvente água ultrapura tipo 1. (\*) incubação a  $60^\circ\text{C}$  / 15 min.



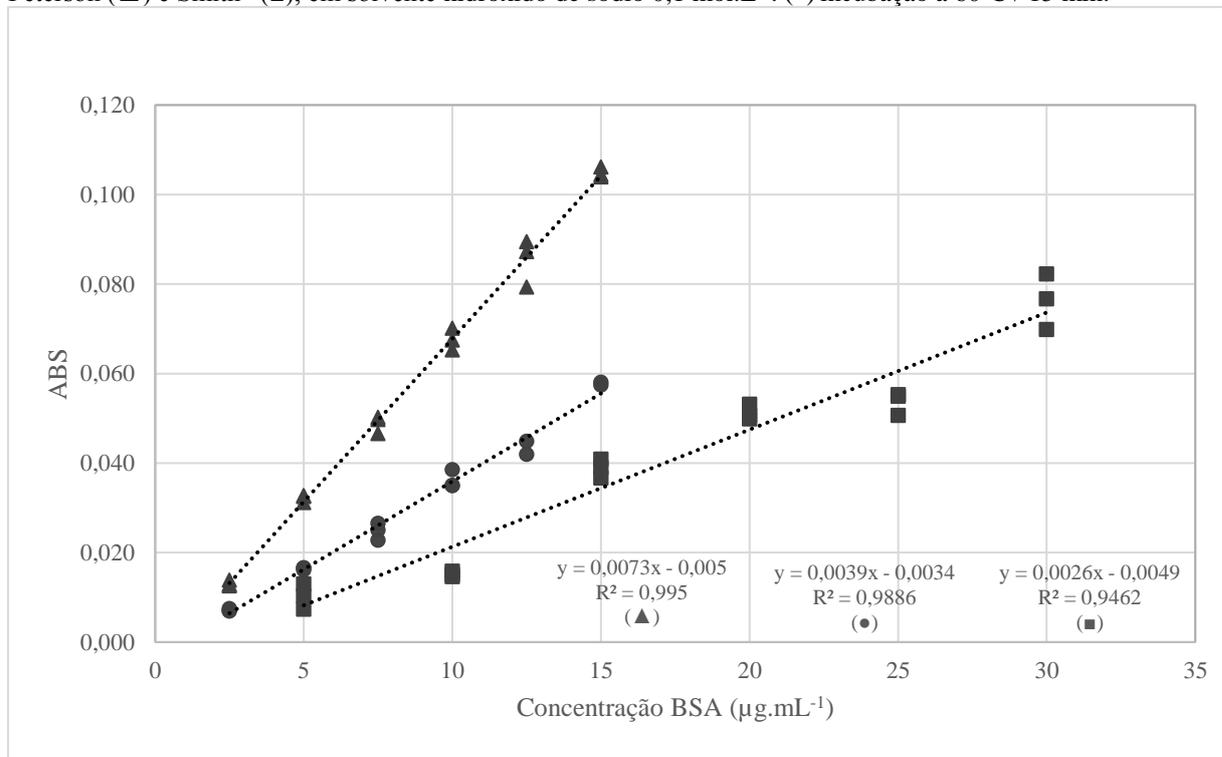
O método de Smith et al (1985), não atendeu à expectativa de obter maior sensibilidade e quantidade de amostra requerida em relação ao método de Lowry et al (1951), mesmo com a utilização de temperaturas de incubação mais elevadas ( $60^\circ\text{C}$ ) para acelerar a velocidade da reação de desenvolvimento da cor.

O princípio da teoria das colisões estabelece que para uma reação química ocorrer, as moléculas dos reagentes devem colidir umas com as outras, isto nos permite explicar a relação

entre a variação da solubilidade do meio reacional com a reatividade (BRADY; HUMISTON, 1986).

A descoberta de Less (1972 apud PETERSON, 1977) de que o SDS em meio alcalino, é um agente de solubilização eficiente para solubilização dos produtos derivados de células (contendo membranas proteicas), como é o caso do PRP. O SDS provavelmente foi o que contribuiu para a maior sensibilidade do método de Peterson em relação aos demais utilizando o mesmo solvente. A desnaturação das proteínas e a maior solubilidade promoveu o aumento da superfície de contato no meio reacional.

Figura 33 - Relação concentração de BSA (Conc. BSA,  $\mu\text{g/mL}$ ) x resposta (Abs) dos métodos Lowry ( $\bullet$ ), Peterson ( $\blacktriangle$ ) e Smith\* ( $\blacksquare$ ), em solvente hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . (\*) incubação a  $60^\circ\text{C} / 15 \text{ min}$ .



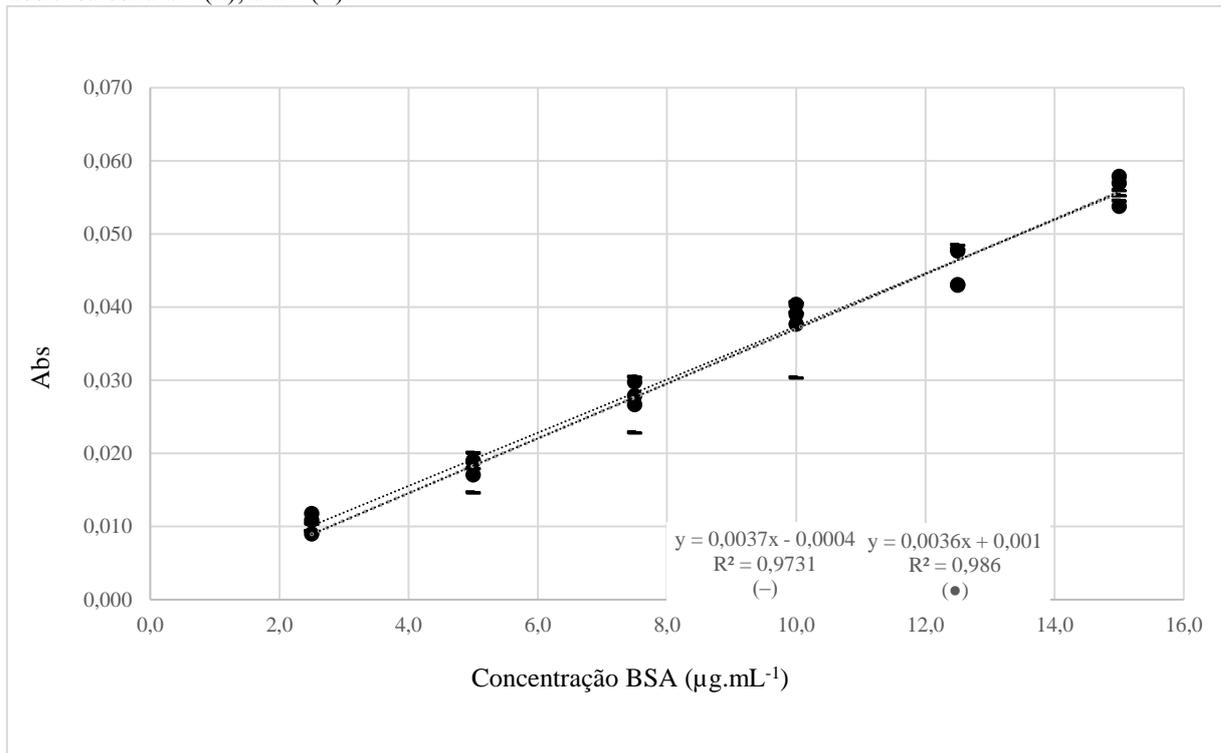
#### 4.2.5 Sensibilidade intra-métodos

Conforme discutido na seção 4.1, antes de se chegar à condição ótima de solubilidade em água, outros solventes (hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e SDS 2% em hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) foram testados e conseqüentemente submetidos aos três métodos de quantificação proteica.

#### 4.2.5.1 Método Lowry

Para o método Lowry foi possível variar os seguintes parâmetros: tipo de solvente (água ultrapura tipo 1 e hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, discutido na seção 4.1), dia de execução do ensaio e volume final do ensaio (1300 µL e 2600 µL).

Figura 34 - Método Lowry, com volume final de 1300 µL, em solvente água ultrapura tipo 1. Variação dos dias dos ensaios: dia 1 (-); dia 2 (●).



Observando-se os gráficos das figuras 34, 35 e 36 constatou-se que não houve mudanças significativas nas curvas de calibração, indiferente às modificações propostas. Confirmando a robustez do método Lowry.

Figura 35 - Método Lowry com volume final de 1300  $\mu\text{L}$ , em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Variação dos dias dos ensaios: dia 1 (○); dia 2 (◆).

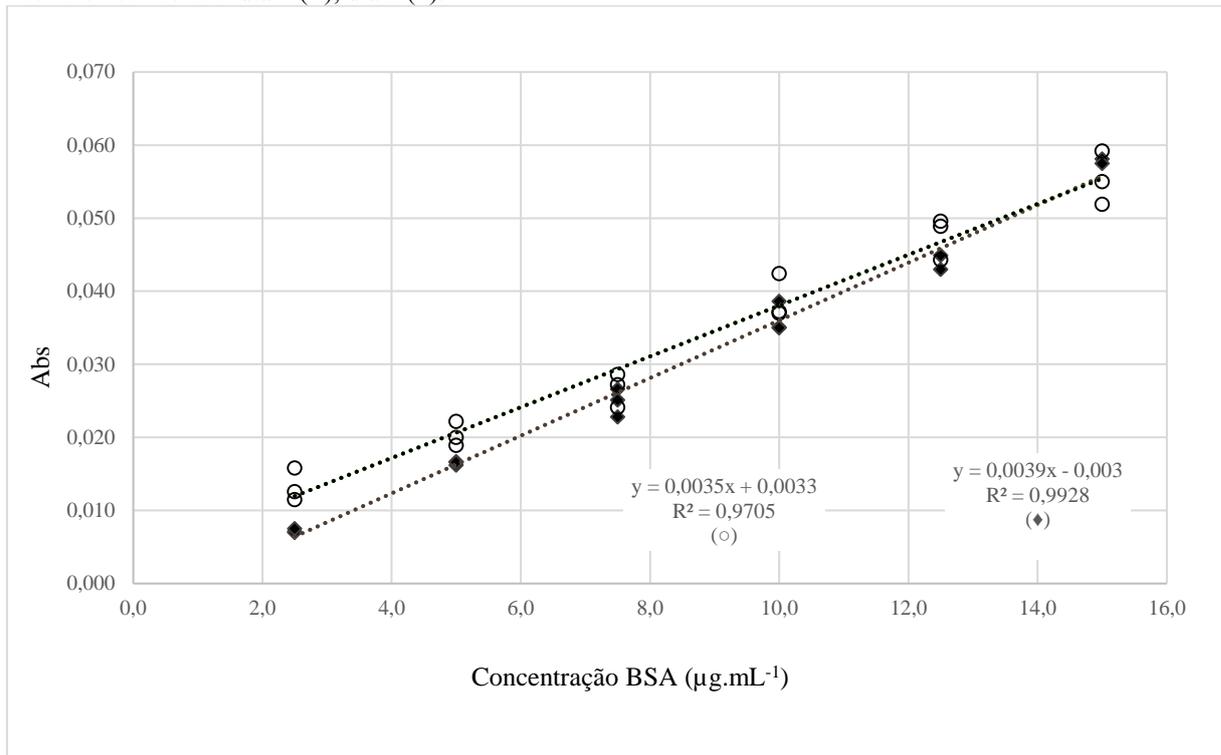
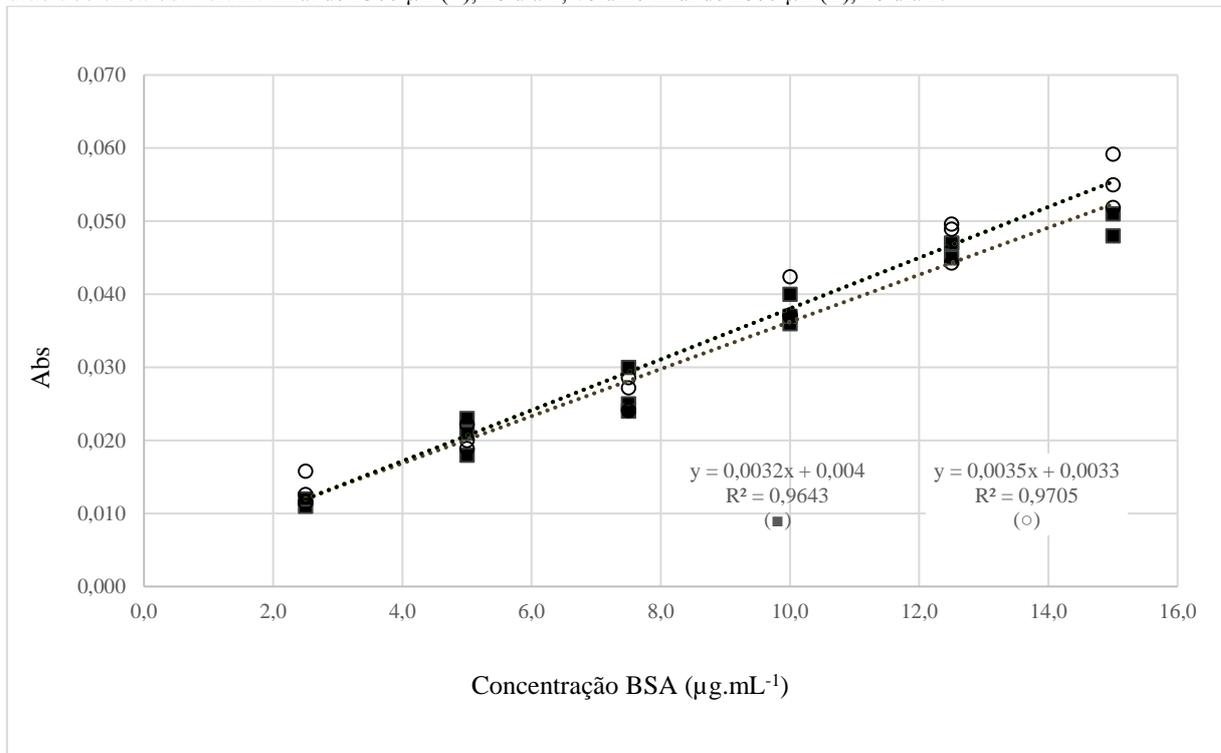


Figura 36 - Método de Folin-Lowry em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Variação dos volumes finais e dias dos ensaios: volume final de 1300  $\mu\text{L}$  (○), no dia 1; volume final de 2600  $\mu\text{L}$  (■), no dia 2.



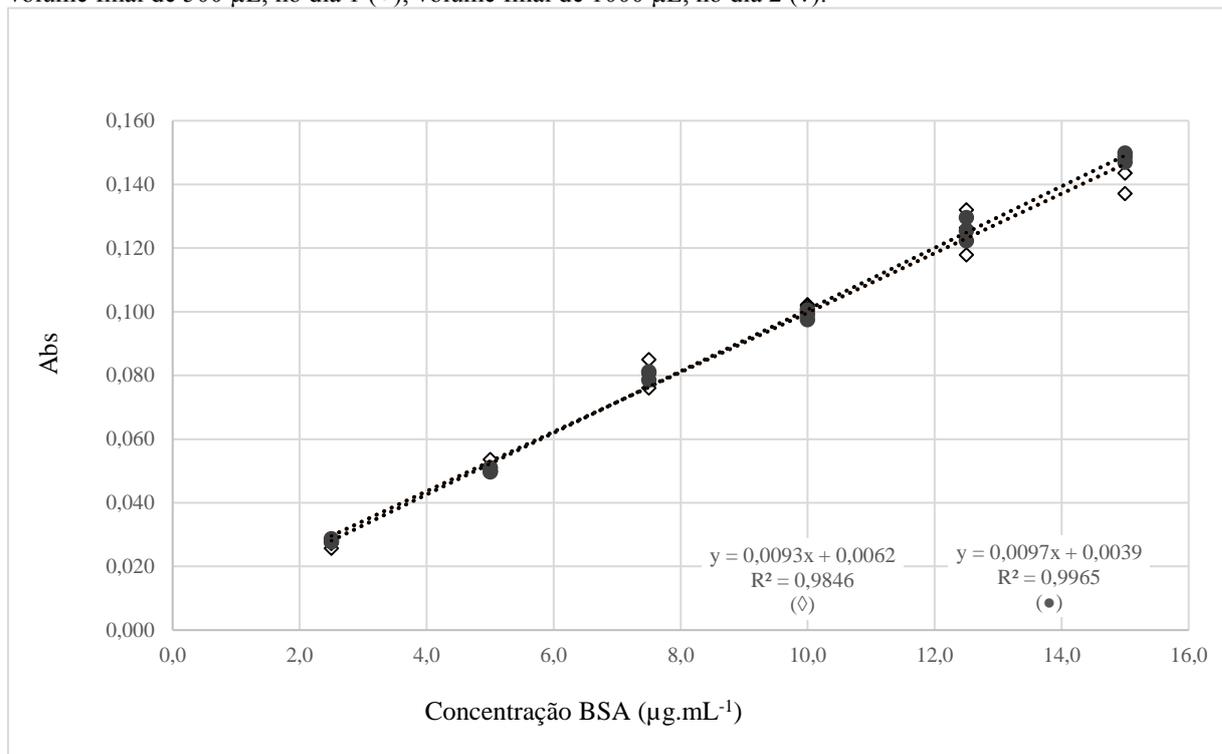
#### 4.2.5.2 Método Peterson (Método Lowry modificado)

Para o método Peterson variou-se o tipo de solvente (água ultrapura tipo 1 e hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e o volume final do ensaio (500 e  $1000 \mu\text{L}$ ).

Conforme discutido na seção 4.1, não se observou nenhuma vantagem na utilização de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em substituição à água como solvente para o método de Peterson, pelo contrário, observou-se que houve diminuição da sensibilidade do método, pela diminuição na inclinação da curva de calibração (figura 25).

A figura 37 reitera a boa reprodutibilidade obtida em solvente água, com a utilização de volumes de alíquotas diferentes.

Figura 37 - Método Peterson em solvente água ultrapura tipo 1. Variação dos volumes finais e dias dos ensaios: volume final de  $500 \mu\text{L}$ , no dia 1 (●); volume final de  $1000 \mu\text{L}$ , no dia 2 (◇).



#### 4.2.5.3 Método Smith

Tendo em vista que no método de Smith, a reação é muito lenta à temperatura ambiente, considera-se que este não é um método de “ponto final” e parâmetros tais como tempo, temperatura e outros devem ser considerados antes de descartar o seu uso na aplicação

desejada. Conforme assinalado por Smith et al (1985), a temperatura de 60°C aparece sendo mais significativa que a temperatura ambiente, devido a uma maior contribuição para o desenvolvimento da cor, proveniente da reação das ligações peptídicas com o íon cobre divalente. Esta é a razão pela qual somente as variáveis tipo de solvente, tempo de reação e adição de SDS foram consideradas para análise.

A figura 38 mostra a diferença entre as sensibilidades do método de Smith no intervalo de concentrações de padrão BSA 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com os tempos de leituras de absorvâncias sendo efetuados após 15 e 30 minutos de reação, indicando um ganho expressivo de sensibilidade com o tempo maior, porém com aumento da dispersão.

Como era de se esperar, no outro intervalo de concentrações entre 5,0 a 30,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 38), nas mesmas condições de tempo e temperatura de incubação, as curvas de calibração apresentam, para a mesma condição, coeficientes angulares relativamente próximos àquele obtido para o intervalo de 2,5 a 15,0  $\mu\text{g/mL}$  (figura 39).

Figura 38 - Método de Smith em solvente hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ . Variação do tempo de incubação. Curva de calibração no intervalo de 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ : 60°C / 15 min ( $\blacktriangle$ ); 60°C / 30 min. (-).

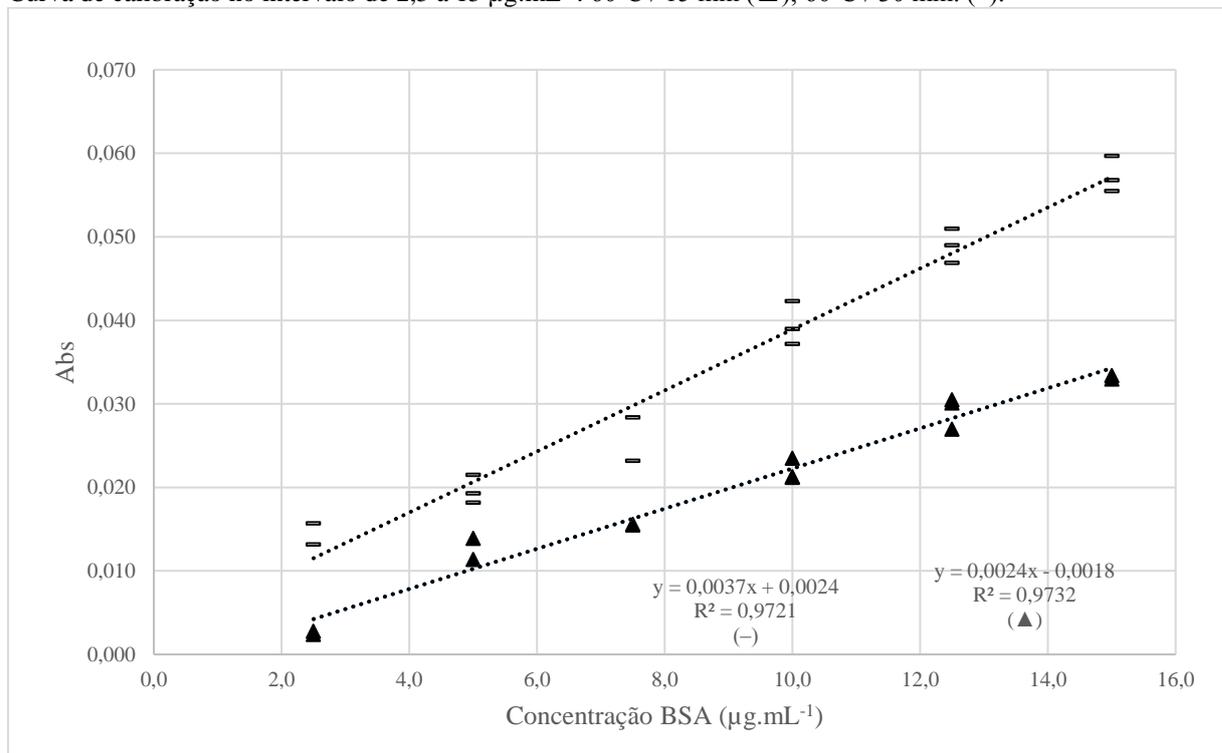
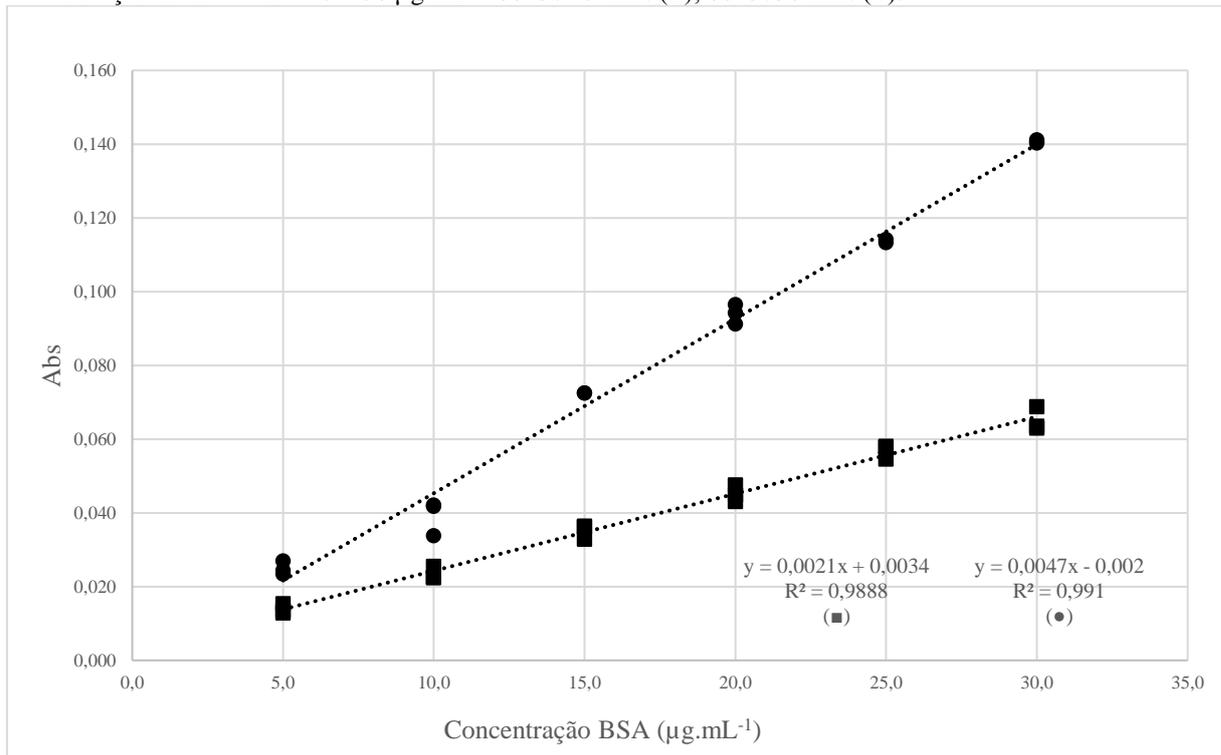


Figura 39 - Método Smith em solvente hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Variação do tempo de incubação. Curva de calibração no intervalo de 5 a 30 µg.mL<sup>-1</sup>: 60°C / 15 min. (■); 60°C / 30 min. (●).



#### 4.2.6 Comparação dos métodos Lowry e Peterson

O método de Smith não foi considerado adequado, pois pequenos incrementos de tempo acarretam modificações substanciais nas leituras de absorvância, devido à reatividade ser uma função do tempo. Este fator é um ponto crítico para a leitura de um número significativo de amostras ao mesmo tempo, portanto o método não é robusto.

Acrescenta-se a isto o fato de que à 60°C o PRP sofre algum tipo de degradação (WHO (2014)), o que poderia gerar subprodutos potencialmente interferentes. Desta forma, daqui para frente, o método Peterson foi o único a ser confrontado com o método clássico de Lowry.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

#### 4.3.1 Seletividade e efeito matriz

A seletividade do método de Peterson foi avaliada em relação aos seus constituintes pela análise das amostras dos três lotes em estudo, no intervalo de concentrações de 1 a 15

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  equivalentes a 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,125 e 0,15 vezes o LME e alíquotas de 400  $\mu\text{L}$ , conforme a tabela 14.

Como os valores de coeficiente de variação dos fatores de matriz (FM) obtidos pela razão da resposta do analito em matriz e a resposta do analito em solução, foram todos muito abaixo do limite estabelecido (< 2% contra 15% de limite) o efeito matriz não foi evidenciado para as amostras os três lotes avaliados, portanto quanto à seletividade e efeito matriz, não houve diferença significativa entre a utilização de matriz (solução de PRP) ou solvente (água ultrapura tipo 1) para o método de Peterson.

Como os valores de coeficiente de variação dos fatores de matriz (FM) obtidos pela razão da resposta do analito, para cada amostra, em matriz, e a resposta do analito em solução, foram todos muito abaixo do limite estabelecido (< 2% contra 15% de limite) o efeito matriz não foi evidenciado para as amostras os três lotes avaliados, portanto quanto à seletividade e efeito matriz, não houve diferença significativa entre a utilização de matriz (solução de PRP) ou solvente (água ultrapura tipo 1) para o método de Peterson.

Os resultados da comparação das seis amostras de PRP fortificadas com BSA a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com as amostras de referência (BSA padrão) na tabela 15.

Tabela 14 - Preparo da curva de calibração de BSA em solvente água ultrapura tipo 1 ou matriz PRP para o método método de Peterson\* (0,01 a 0,15 LME).

Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Padrão BSA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\mu\text{L}$ )	Água ultrapura tipo 1 ou Solução de PRP a 10 $\text{mg}/\text{mL}$ 0020( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )
0	0	400	400
1	*	*	*
2,5	20	380	400
5	40	360	400
7,5	60	340	400
10	80	320	400
12,5	100	300	400
15	120	280	400

(\*) Para o nível 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi usado 40 mL de uma solução padrão BSA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 360  $\mu\text{L}$  de solvente água ou solução de PRP.

Tabela 15 - Método Peterson: Avaliação da seletividade e do efeito matriz.

Amostras PRP	Método	Média Amostras de PRP fortificadas (Abs)	Média Conc. Amostras de PRP fortificadas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Varição intracorrida Amostras PRP fortificadas CV (%)	CV FM <sup>1</sup> (%)
Lote 1	Peterson	0,0746	8,40	2,06	1,68
Lote 2	Peterson	0,0859	9,68	6,96	1,94
Lote 3	Peterson	0,0810	9,13	9,36	1,83

(1) CV FM refere-se ao coeficiente de variação encontrada para a razão entre as leituras do branco de PRP fortificado com BSA e do valor de referência (BSA a  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de todas as amostras, cujo valor médio experimental para o método de Peterson foi de 0,0449 (Abs), CV = 2,30% e concentração média foi de  $4,988 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=5$  e  $\alpha=0,95$ ).

Foram calculados, os teores de proteína residual em termos percentuais nas amostras de PRP dos lotes 1, 2 e 3 pela equação 7, para as amostras fortificadas a  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , preparadas conforme a seção 3.2.2.3 cujos resultados são apresentados na tabela 16.

Para confirmar os resultados do efeito matriz tabela 15 e da quantificação (tabela 16), foi testado também o efeito de matriz por semelhança entre as curvas de calibração na matriz (solução de PRP a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e no solvente (água ultrapura tipo 1) para o método de Peterson no mesmo intervalo de concentrações de  $1,0$  a  $15,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (figuras 40; 41 e 42).

Tabela 16 – Teores de proteína residual em termos percentuais nas amostras de PRP usando curva na matriz

Amostras PRP	Método	Curva de calibração	Proteína residual Brancos PRP (%)	CV (%)
Lote 1		$y = 0,0081x + 0,0393$	0,0400	0,76
Lote 2	Peterson	$y = 0,08942x + 0,0372$	0,0456	7,22
Lote 3		$y = 0,00857x + 0,0360$	0,0405	9,73

$n=6$ ;  $\alpha=0,95$

Figura 40- Comparação das curvas em solvente e em matriz pelo método Peterson (1 a 15 µg.mL<sup>-1</sup> BSA). Curva na matriz<sup>2</sup> PRP Lote 1 (●); curva em solvente água<sup>1</sup> (○).

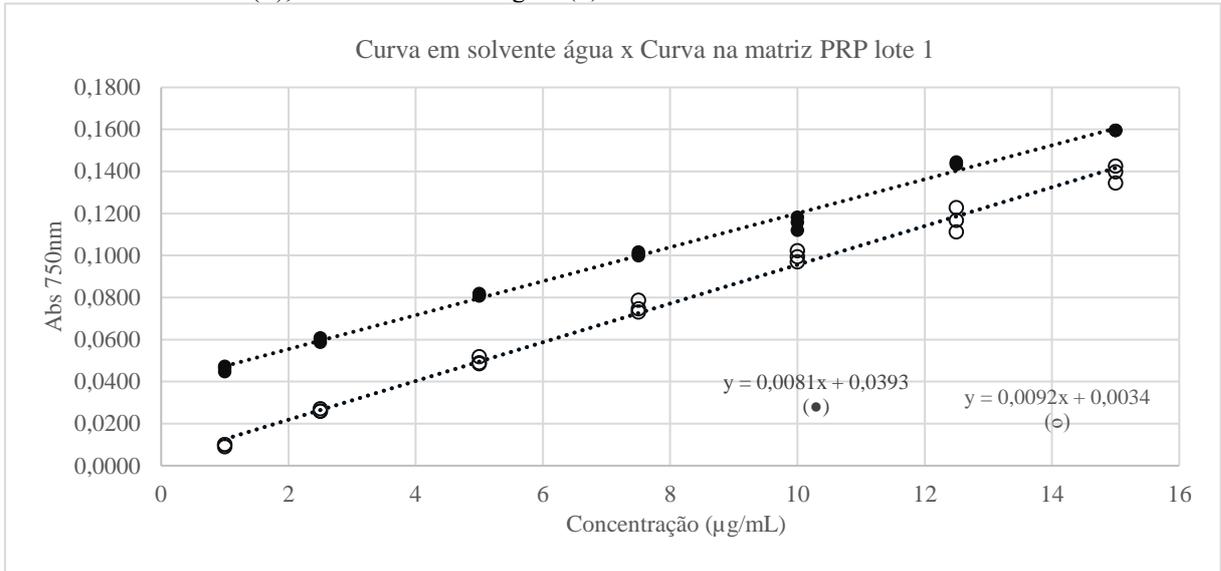


Figura 41- Comparação das curvas em solvente e em matriz pelo método Peterson (1 a 15 µg.mL<sup>-1</sup> BSA). Curva na matriz<sup>3</sup> PRP Lote 2 (▲); curva em solvente água<sup>1</sup> (○).

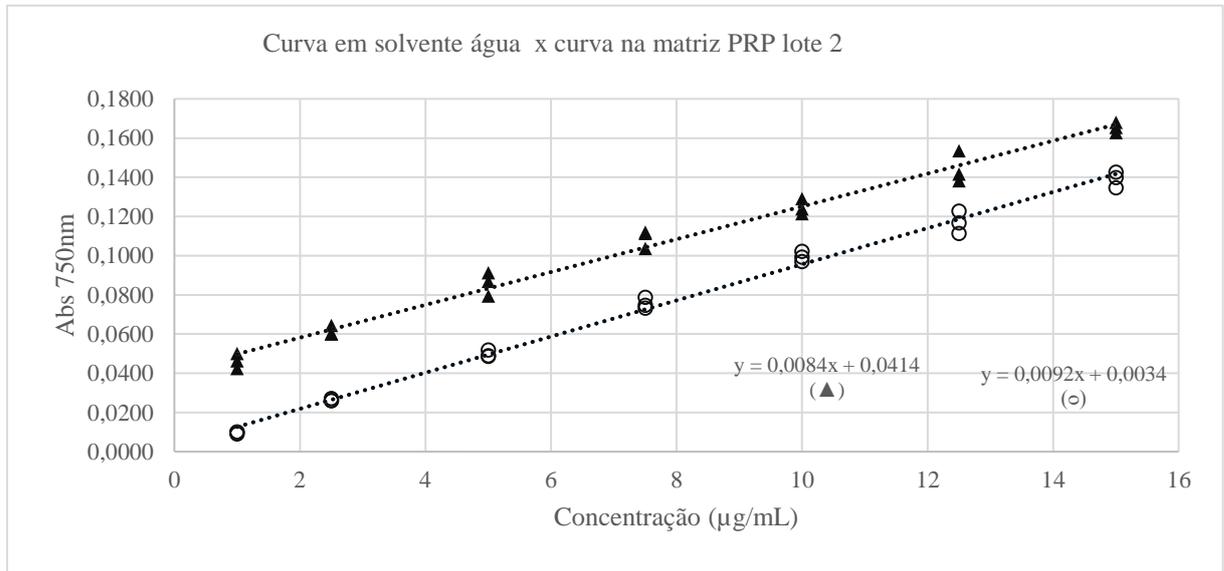


Figura 42- Comparação das curvas em solvente e em matriz pelo método Peterson (1 a 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA). Curva na matriz<sup>4</sup> PRP Lote 3 ( $\blacklozenge$ ); curva em solvente água<sup>1</sup> ( $\circ$ ).

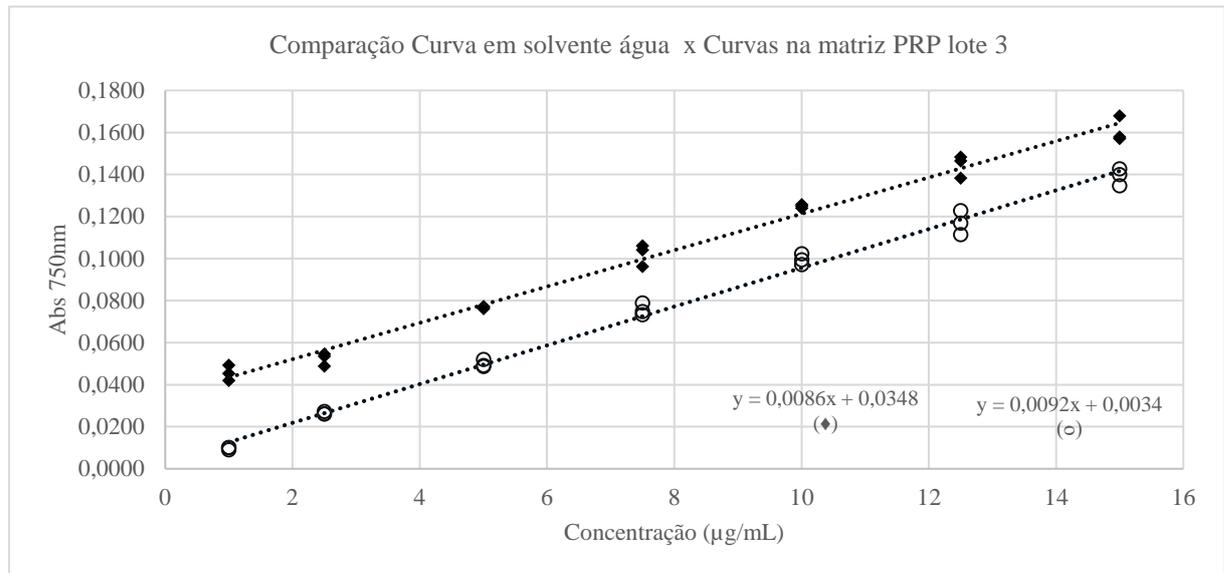


Tabela 17 - Resultados obtidos da comparação entre as curvas do método Peterson no intervalo de 1 a 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA (0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,15 LME ) em solvente e em matriz.

Curvas de calibração $y = a + bx$	Médias (Abs)	$F_{\text{tab.}}$	$F_{\text{calc}}$	p	$t_{\text{tab}}$	$t_{\text{calc}}$	p
Solvente <sup>1</sup> H <sub>2</sub> O $y = 0,0034 + 0,0092x$ $r = 0,9967$	0,0097; 0,0264; 0,0498; 0,0756; 0,0996; 0,1170; 0,1390	-	-	-	-	-	-
Matriz <sup>2</sup> Lote 1 $y = 0,0393 + 0,0081x$ $r = 0,9976$	0,0462; 0,0601; 0,0814; 0,1007; 0,1154; 0,1439; 0,1596	4,28	1,29	0,38	2,18	1,14	0,28
Matriz <sup>3</sup> Lote 2 $y = 0,0414 + 0,0842x$ $r = 0,9940$	0,0463; 0,0616; 0,0859; 0,1091; 0,1249; 0,1445; 0,1655;	4,28	1,05	0,47	2,18	1,26	0,23
Matriz <sup>4</sup> Lote 3 $y = 0,0348 + 0,0087x$ $r = 0,9945$	0,0455; 0,0523; 0,0767; 0,1021; 0,1248; 0,1443; 0,1609	4,28	1,14	0,44	2,18	1,09	0,30

$n = 3$ ;  $l = 7$  ( $C_{\text{tabelado}} = 0,5612$ ); (1)  $C_{\text{calc}} = 0,478$ ; (2)  $C_{\text{calc}} = 0,414$ ; (3)  $C_{\text{calc}} = 0,417$ ; (4)  $C_{\text{calc}} = 0,313$ .

Foi testada a linearidade de cada uma destas curvas (figuras 40, 41 e 42) aplicando o teste de Cochran ( $n = 3$ ;  $l = 7$ ), o teste F e o teste t utilizando o programa Excell, conforme INMETRO (2013) e demonstrados na tabela 17.

Após comparar os resultados obtidos concluiu-se que a curva em solvente foi estatisticamente não significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) em relação às curvas obtidas em matriz de PRP.

#### 4.3.2 Intervalo de medição e intervalo linear (função da calibração)

No intervalo de concentrações estudado, ao contrário da proposta de Peterson (1983) e de Smith (1985), não foi necessária a utilização de transformação logarítmica a fim de tornar o método linear.

A menor concentração aceitável é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado (INMETRO, 2011). Apesar de obter-se para o método de Lowry um limite de detecção de  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando-se água como solvente, os valores críticos calculados pelo teste de Cochran (tabela 16) para todas as curvas avaliadas foram satisfatórios, portanto pode-se considerar que a menor concentração estudada (0,025 LME), pertence ao intervalo linear do método.

Neste mesmo intervalo, em todas as curvas avaliadas pelo método de Peterson a relação concentração / resposta foi muito maior que 10. O método foi então avaliado para 0,010 LME e como a relação concentração / resposta obtida foi  $>10$ , estabeleceu-se o limite inferior do intervalo como sendo 0,010 LME. Assim, o intervalo linear, a princípio, foi estabelecido como 0,01 a 0,15 LME, cujas concentrações equivalem a 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Na avaliação da curva de 1 a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a linearidade também foi comprovada. O coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido pelo método de Peterson para todas as curvas de calibração em água foi maior que 0,99, então o intervalo linear foi muito mais amplo que o obtido para o método Lowry.

Para verificar o ajuste ao modelo matemático proposto de regressão linear de primeira ordem, obtido para os métodos Peterson e Lowry, efetuou-se a comparação utilizando o programa Excel. Confirmou-se que o melhor ajuste é o linear de primeira ordem, pela

comparação entre os coeficientes de correlação ( $r$ ), com a aplicação deste modelo a um modelo linear de segunda ordem e outro não linear polinomial. Segundo Peterson (1983), o método de Lowry modificado não apresenta relação linear num intervalo mais extenso da curva de calibração ( $0-2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de BSA), porém para o intervalo de concentração em que foi realizado este estudo ( $1,0$  a  $15,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), confirmou-se a linearidade da função de calibração instrumental no segmento de reta utilizado.

Para os métodos de Peterson e de Lowry, não foram identificados desvios da linearidade no ajuste pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Os gráficos de valores previstos versus resíduos observados também não sugeriram desvios da linearidade no intervalo de medição estudado ( $0,025$  a  $0,15$  LME), conforme apresentado nas figuras 43 e 44. Com a ampliação do intervalo de  $0,010$  a  $0,15$  LME, também não foram observados resíduos não aleatórios, sugerindo um intervalo ainda mais amplo de linearidade, de  $1$  a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 45).

O intervalo linear do espectrofotômetro *Agilent Cary 60* também demonstrou ser mais amplo que o intervalo de medição estudado inicialmente (visto pelas leituras obtidas) para confecção das curvas de calibração, sendo  $0,025$  a  $0,15$  vezes o LME para o método Lowry e  $0,01$  a  $0,15$  vezes o LME para o método Peterson.

Figura 43 - Gráfico de resíduos: Método Lowry em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de  $2,5$  a  $15 \mu\text{g/mL}$  ( $0,025$  a  $0,15$  LME).

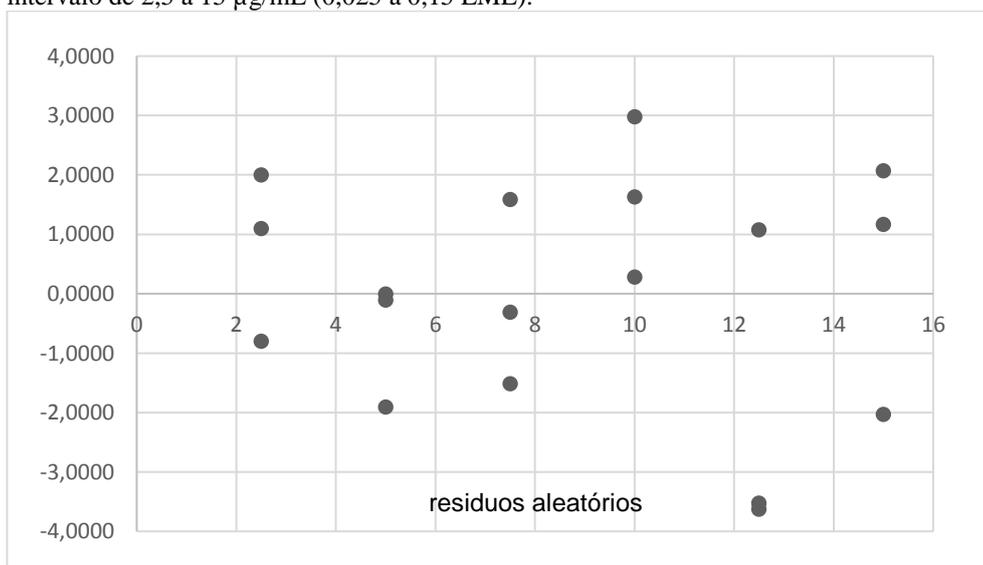


Figura 44 - Gráfico de resíduos: Método de Peterson em solvente água ultrapura tipo 1 no intervalo de  $2,5$  a  $15 \mu\text{g/mL}$  ( $0,025$  a  $0,15$  LME).

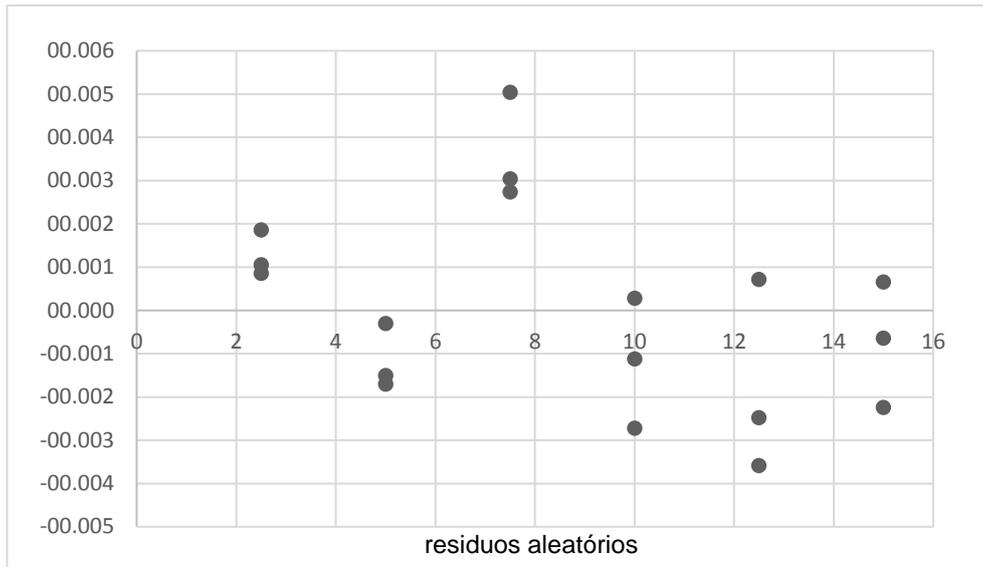
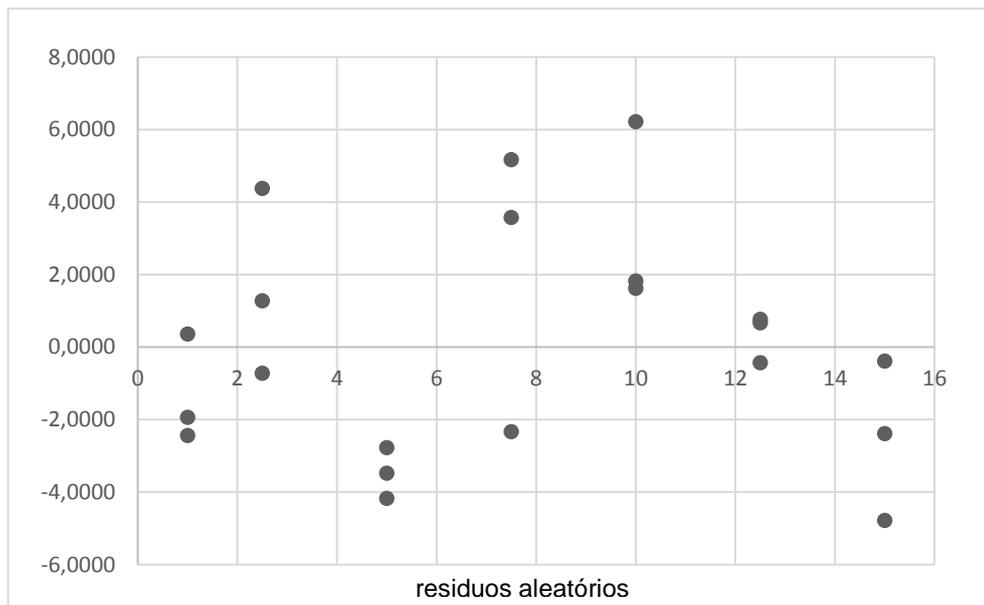


Figura 45 – Gráfico de resíduos - Método de Peterson em solvente água utrapura tipo 1 no intervalo de 1 a 15  $\mu\text{g/mL}$  (0,010 a 0,15 LME).



O intervalo linear do espectrofotômetro *Agilent Cary 60* também demonstrou ser mais amplo que o intervalo de medição estudado inicialmente (visto pelas leituras obtidas) para confecção das curvas de calibração, sendo 0,025 a 0,15 vezes o LME para o método Lowry e 0,01 a 0,15 vezes o LME para o método Peterson.

#### 4.3.3 Linearidade (intervalo linear do método) e sensibilidade

Com base nos resultados obtidos para seletividade e efeito matriz discutidos na seção 4.3.1, as curvas de calibração puderam ser preparadas em solvente água ultrapura.

A regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários indicou ser adequada e o intervalo linear do método de Peterson na presença de matriz ou solvente (água ultrapura tipo 1) foi de 0,010 a 0,15 LME (equivalentes às concentrações de 1,0 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), na primeira avaliação, mais amplo do que o intervalo linear do método de Lowry (0,025 LME a 0,15 LME, ou seja, de 2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

O parâmetro massa foi utilizado nas comparações entre os métodos, a despeito das considerações sobre o volume final de cada método. Pode-se afirmar que o método de Peterson apresentou a melhor resposta para a mesma quantidade de massa adicionada neste nível de concentração.

Considerando que a sensibilidade é dada pelo coeficiente angular  $b_1$  das curvas de calibração descritas como  $y = b_0 + b_1 x$ , concluiu-se que o método de Peterson é o mais sensível, dada a magnitude do coeficiente angular em comparação com os obtidos para o método de Lowry, como pode ser observado na tabela 18. Embora seja largamente empregado como indicação de qualidade do ajuste do modelo o coeficiente de regressão  $R^2$  é interpretado equivocadamente como teste de linearidade e não deve ser utilizado de forma isolada, devendo ser utilizado apenas para descrever o modelo.

Tabela 18 - Dados das curvas de calibração nos intervalos estudados (0,01 a 0,15 e 0,025 a 0,15 LME)

Método	Equação da reta	$R^2$	r	$C_{\text{tabelado}}^3$	$C_{\text{calculado}}^3$
Lowry	$0,0010 + 0,0036 x$	0,9860	0,9930	0,6161	0,374
Peterson <sup>1</sup>	$0,0039 + 0,0097 x$	0,9965	0,9990	0,6161	0,424
Peterson <sup>2</sup>	$0,0042 + 0,00107 x$	0,9966	0,9983	0,5612	0,422

(1) 0,025 a 0,15 LME (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 12,5 e 15,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

(2) 0,01 a 0,15 LME (1,0; 2,5; 5; 7,5; 10,0; 12,5 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

(3)  $C_{\text{tabelado}}$  e  $C_{\text{calculado}}$  referem-se aos valores críticos e calculados pelo teste de Cochran para comparação de variâncias.

#### 4.3.4 Precisão (Repetibilidade)

As amostras brancas de PRP dos três lotes em estudo foram avaliadas pelos métodos Lowry e Peterson, utilizando uma curva de calibração preparada em solvente (água ultrapura tipo 1).

Os coeficientes de variação do método de Peterson obtidos para as leituras dos brancos de PRP (sem fortificação e sem a etapa de secagem prévia) podem ser observados na tabela 17. Foram utilizadas as mesmas amostras de branco de PRP para os dois métodos.

Como pode ser observado na tabela 19, a variabilidade demonstrada pelos intervalos de confiança e coeficientes de variação (CV%) nas medições das amostras brancas de PRP pelo método de Folin-Lowry é muito maior que a demonstrada pelo método de Peterson. Então, com os resultados apresentados até aqui, pode-se afirmar que o método de Peterson no intervalo de concentrações estudado entre 2,5 e 15 µg/mL (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL), comparado ao método Lowry demonstrou maior precisão, mesmo trabalhando-se próximo ao limite de detecção (conforme discutido adiante na seção 4.3.6).

Tabela 19 - Repetibilidade para os métodos Peterson e Lowry. Amostras brancas de PRP preparadas em solvente<sup>1</sup>.

Amostras PRP	Método	Média Br. PRP (Abs)	Desvio Padrão (Abs)	Intervalo de confiança (Abs)	CV (Abs)
Lote 1	Peterson	0,0444	0,0031	0,0019	6,89
	*Lowry	0,0093	0,0033	0,0021	33,79
Lote 2	*Peterson	0,0441	0,0027	0,0009	6,10
	* Lowry	0,0122	0,0029	0,0018	23,56
Lote 3	Peterson	0,0464	0,0024	0,0019	4,95
	Lowry	0,0118	0,0027	0,0017	22,45

n = 10;  $\alpha=0,95$

(\*) n = 9

(1) Amostras brancas de PRP preparadas conforme seção 3.2.3.1 e 3.2.3.2 em solvente água ultrapura tipo 1.

Os coeficientes de variação obtidos foram muito abaixo de 15%, critério previsto pela Anvisa (BRASIL, 2003a) para métodos bioanalíticos, para os três lotes de amostras brancas de PRP analisadas pelo método de Peterson. Estes resultados confirmam os apresentados nas seções 4.2.1 e 4.2.2 (tabelas 6 e 8).

Cumpra ressaltar que na avaliação inter-lotes analisados pelo método de Peterson, os valores de concentração (%) estimados para a proteína residual foram muito próximos (tabela 6), “falando” isto favoravelmente ao método de preparação do PRP, pelo menos em relação à proteína. Tal fato não foi constatado pelo método Lowry (tabelas 3 e 6). Além do método de Peterson mostrar maior sensibilidade que o método clássico de Lowry, a assertiva anterior reforça a melhor atuação desse método na análise em questão.

#### 4.3.5 Exatidão (recuperação)

A tabela 20 mostra os resultados obtidos para os métodos de Peterson e de Lowry, com fortificação a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Foi realizada no intervalo de 1 a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o método de Peterson e para o método Lowry no intervalo de 2,5 a  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Pode-se verificar que a recuperação do analito pelo método de Peterson demonstrou também maior exatidão nas determinações que o método clássico de Lowry et al.

Tabela 20 - Recuperação do analito (BSA a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pelo método Peterson (0,01 a 0,15 LME) e pelo método Lowry (0,025 a 0,15 LME).

Método	Leituras obtidas (Abs)	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	CV (%)	Curva	Eficiência (%)
Peterson	0,0451; 0,0464; 0,0443; 0,0448; 0,0438	$4,86 \pm 0,10$	2,30	$y = 0,0021 + 0,0088x$ $r = 0,9987$	97,20
Lowry	0,0180; 0,0201; 0,0170; 0,0160; 0,0180	$4,78 \pm 0,36$	8,58	$y = 0,0001 + 0,0037x$ $r = 0,9983$	95,78

$n = 5$ ;  $\alpha = 0,95$

#### 4.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Como as curvas de calibração obtidas experimentalmente para os métodos de Peterson e de Folin-Lowry demonstraram linearidade e homogeneidade das variâncias (homoscedasticidade), o limite de detecção e de quantificação, foi avaliado, pressupondo a normalidade dos dados, pelas equações 4 e 5 (tabela 21).

$$LD = DP_a \times 10 / Ca \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = DP_a \times 3 / Ca \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo,

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

$DP_a$  = Desvio padrão do intercepto com o eixo y

Ca = Coeficiente angular (Inclinação da curva)

Tabela 21 - Limite de detecção e de quantificação dos métodos Peterson (0,01 a 0,15 LME) e Lowry (0,025 a 0,15 LME)

Método	Equação da reta $y = ax + b$	Limite de detecção (LD) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Limite de quantificação (LQ) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
Lowry	$y = 0,0010 + 0,0036x$ $r = 0,9932$	4,6	15,4
	$y = 0,0001 + 0,0037x$ $r = 0,9983$		
	$y = -0,0004 + 0,0037x$ $r = 0,9860$		
Peterson	$y = 0,0043 + 0,0107x$ $r = 0,9983$	0,1	0,5
	$y = 0,0034 + 0,0092x$ $r = 0,9967$		
	$y = 0,0039 + 0,0097x$ $r = 0,9983$		

$n = 3$ .  $LD = DP_a \times 10 / b$  e  $LQ = DP_a \times 3 / b$ , sendo,  $DP_a$  = desvio padrão do intercepto com o eixo y e b = coeficiente angular.

Os limites de detecção e de quantificação obtidos para o método de Lowry são similares aos obtidos por Santos (2012). Para o método de Peterson foi testado experimentalmente o limite de quantificação de até  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , então pode-se afirmar que o método de Peterson é muito mais preciso e exato quando comparado ao método de Lowry.

O limite de quantificação foi testado experimentalmente para o método de Lowry e obteve-se CV% muito acima de 15% nas determinações à  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , confirmando a inexactidão do método neste nível de concentração.

Para o método de Peterson foi testado o limite de até 1  $\mu\text{g/mL}$ , obtendo-se resultados experimentais muito próximos dos resultados teóricos e CV(%) muito abaixo de 15%, portanto pode-se almejar reduzir ainda mais o limite inferior para o método de Peterson, para a quantificação de proteínas residuais nas amostras de PRP.

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SELECIONADO PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PRP

Parte das mesmas amostras dos três lotes experimentais de PRP utilizadas na avaliação de desempenho do método foram empregadas para análise em condições de rotina.

Os dados obtidos foram utilizados para estimar as massas necessárias para a determinação do percentual de proteína residual na base seca das amostras dos polissacarídeos PRP, obtidas indiretamente do ensaio para determinação de umidade residual utilizando massas iniciais de 200 mg. Os resultados estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22 - Umidade residual das amostras de PRP

Amostras PRP	Massa inicial (mg)	Massa seca (%)	Umidade residual (%)
Lote 1	203,8	193,1	5,25
Lote 2	200,1	186,4	6,85
Lote 3	199,5	187,5	6,00

O teste de exatidão (seção 4.3.5) foi repetido a  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em solvente água ultrapura tipo 1 e o desempenho do método selecionado neste nível de concentração foi confirmado. Pode-se verificar o coeficiente de variação muito satisfatório, confirmando a acurácia neste nível de concentração. Os resultados obtidos para a recuperação do analito pelo método de Peterson estão exibidos na tabela 23.

Tabela 23 - Recuperação do analito (BSA a 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pelos métodos Peterson (0,01 a 0,15 LME).

Método	*Curva	r	Leituras (Abs)	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Eficiência (%)
Peterson	$y = 0,0092 x + 0,0034$	0,9984	0,0451; 0,0464; 0,0443; 0,0448; 0,0438	4,89; 5,03; 4,79; 4,85; 4,74	3,33	97,21

$n = 5; \alpha = 0,95.$

(\*)  $n=3; l=7; C_{\text{tab}} = 0,5612; C_{\text{calc}} = 0,389$

Observa-se pelos resultados obtidos para as amostras brancas de PRP sem fortificação (vide tabela 8) utilizando a curva de calibração em solvente (água ultrapura do tipo 1) demonstraram maior precisão e homogeneidade entre os lotes em relação aos resultados obtidos utilizando a curva de calibração na matriz de PRP com amostras fortificadas com BSA a 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (tabela 16).

Estes resultados confirmam os obtidos na comparação entre as curvas fornecidas em solvente em relação às curvas utilizando matriz PRP de cada lote testado (tabela 17).

## 5 CONCLUSÃO

A adequação do intervalo de quantificação, ajustando a quantidade mais esperada do analito próximo à região central da curva de calibração e a redução da temperatura no preparo das amostras contribuíram tanto para o método de Lowry quanto para o método de Peterson na solubilidade, diminuição do tempo de análise e redução da variabilidade dos resultados. No entanto, no intervalo estudado (2,5 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), o método de Lowry demonstrou baixa precisão produzindo resultados com coeficiente de variação muito acima do limite aceitável para os ensaios bioanalíticos (15%) e com as leituras das absorvâncias das amostras abaixo limite de quantificação do método.

O segundo método confrontado ao método de Lowry, o de Smith, não correspondeu às expectativas quanto à sensibilidade no intervalo de quantificação estudado, fornecendo os piores resultados, em quase todos os parâmetros de avaliação de desempenho. Não obstante, devido à necessidade de incubação a 60°C, demonstrou ser inadequado para quantificação das amostras dos polissacarídeos *Haemophilus Influenzae* tipo b que não são estáveis a esta temperatura.

Conclui-se que o método de Peterson (1983), demonstrou ser muito mais adequado que o método de Lowry et al (1951) para a quantificação de proteínas das amostras de PRP, devido à sensibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação adequados ao intervalo de concentrações das amostras, sendo também aplicável a outros produtos para os quais a quantificação de proteínas em nível residual ainda é um ensaio crítico. Além dos diferenciais observados no método de Peterson em sensibilidade e precisão, não foi evidenciado efeito matriz significativo, obtendo-se a confirmação dos resultados da quantificação com a fortificação das amostras a 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Outros benefícios subjacentes ao uso do método proposto foram obtidos, tais como a redução de resíduos de análise e a redução do tempo de análise, isto sem impacto econômico no investimento em treinamentos dos analistas ou na compra de novos materiais ou equipamentos.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectiva futura pretende-se implantar o método de Peterson em substituição à metodologia usada em Bio-Manguinhos para a quantificação de proteínas nos polissacarídeos de *Haemophilus Influenzae* tipo b, o poliribosil ribitol fosfato (PRP) e dos demais produtos que apresentam características semelhantes, tais como os polissacarídeos meningocócicos e a vacina de poliomielite inativada (IPV).

## REFERÊNCIAS

- AKTAPurifier GE. **Size Exclusion Chromatography Principles and Methods**. Disponível em:  
<[http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18102218\\_20141208003707.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18102218_20141208003707.pdf)>. Acesso em: 27/01/2014.
- AMERICAN CYANAMID COMPANY (Stamford, CT). KUO, Joseph S. **Combined Haemophilus Influenzae type b and pertussis vaccine**. USP n. 4196192, 28 outubro 1977, 01 abril, 1980.
- AYRES, J. R. M. **Sobre o risco: para compreender a epidemiologia**. 3ª Ed. São Paulo: Hucitec, 2008.
- BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **Química geral**. 2. Ed. São Paulo: LTC, 1986. v.2.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p.248-254, Janeiro 1976.
- BRASIL. **Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Disponível em  
<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/18080.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18080.htm)>. Acesso em 05/06/2014.
- BRASIL. **Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19782.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19782.htm)>, acesso em 29/05/2014.
- BRASIL, **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003a. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 02/04/2015.
- BRASIL. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília, 2003. 2003b. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro\\_30\\_anos\\_pni.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro_30_anos_pni.pdf)>. Acesso em 22/08/2014.
- BRASIL. **PORTARIA Nº 2.031, DE 23 DE SETEMBRO DE 2004 Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública**. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/813ba5804e90ec00ad12af8a610f4177/PORTARIA+N%C2%BA+2.031,+DE+23+DE+SETEMBRO+DE+2004.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 15/04/2016.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica**. Brasília: 2005. 46p. Tradução de: Selection, use and interpretation of proficiency

testing (PT) schemes by laboratories. Nederland: 2000. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a021b9004745968d9e60de3fbc4c6735/laboratorios.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 03/04/2016.

BRASIL. Lei Nº 11.972, de 6 de Julho De 2009. **Altera a Lei 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999, para dispor sobre as certificações de Boas Práticas para os produtos sujeitos ao regime de Vigilância Sanitária.** 2009a. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Lei/L11972.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L11972.htm)>, acesso em 29/05/2014.

BRASIL. Calendário de vacinação. Portal Brasil, 29/12/2009. 2009b (modificado em: 28/07/2014). Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2009/12/campanhas-de-vacinacao-2>>. Acesso em 04/06/2014.

BRASIL. **Resolução RDC Nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.** Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017\\_16\\_04\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html)>. Acesso em 05/06/2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.** 2012a. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudo com fins de registro e pós-registro de medicamentos. DOU 22/mai/2012.

BRASIL. **Casos de meningite em crianças brasileiras diminuíram nos últimos dois anos.** Portal Brasil, 18 Outubro 2012. 2012b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/casos-de-meningite-em-criancas-brasileiras-diminuiram-nos-ultimos-dois-anos>>. Acesso em 03/02/2016 às 19:15hs.

BRASIL. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 54, de 10 de dezembro de 2013.** 2013b. Dispõe sobre a implantação do sistema nacional de controle de medicamentos e os mecanismos e procedimentos para rastreamento de medicamentos na cadeia dos produtos farmacêuticos e dá outras providências. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0054\\_10\\_12\\_2013.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0054_10_12_2013.pdf)>. Acesso em 05/06/2014.

BRASIL. Lei Nº 12.864, de **24 de setembro de 2013.** 2013a. Altera o **caput** do art. 3º da Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, incluindo a atividade física como fator determinante e condicionante da saúde. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2013/Lei/L12864.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2013/Lei/L12864.htm)>. Acesso em 24/03/2016.

BROWN, R. E.; JARVIS, K. L.; HYLAND, K. J. Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. **Analytical Biochemistry**, 180, 136-139, 1989.

COSTA, E.A. (Org.). **Vigilância Sanitária: temas para debate.** EDUFBA, - Salvador: 2009.

CRISEL, M. R.; BAKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b: Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 250, nº 13, p.4926-4930, Jul. 1975.

CURSO, 2013, Rio de Janeiro (Campus do Inmetro). **Validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2013. 1 CD-ROM.

FARMACOPÉIA Européia, 7.0 v. I, França, p.147-150. 2011.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **J Biological chemistry**, USA, v. 177, p.751-766, 1949.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 8. Ed. New York: W. H. Freeman and company, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008**, Rev. 04. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos** – Rio de Janeiro, 2011.

JOHNSON, M. Protein Quantitation. **Labome: Mater Methods**. New Jersey, EUA, 2012. Disponível em:  
<<http://www.labome.com/method/Protein-Quantitation.html>>. Acesso em 10/08/2014

JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. Vaccine Process Technology. **Biotechnology and Bioengineering**. London, UK, Vol. 109, p. 1446-1460, Fevereiro, 2012. Disponível em:  
<<https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/mpti/2013/selecao/vaccine-process-technology.pdf>>. Acesso em 10/08/2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biological Chemistry**, n. 193, 265–275, 1951.

LÖWY, I. **Vírus, mosquitos e modernidade: a febre amarela no Brasil entre ciência e política**. Tradução de Irene Ernest Dias. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2006.

MARTINEAU, E. et al. Non-linear effects in quantitative 2D NMR of polysaccharides: Pitfalls and how to avoid them. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 108, p.78-85, fev. 2015.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. 2003. 133 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, princípios da bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 3. ed. São Paulo: Câmara brasileira do livro, 2002.

OLSON, B.J. S. C.; MARKWELL, J. Assays for Determination of Protein Concentration. In: *Current Protocols in Protein Science*. **Wiley online library**, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0304s48/abstract>>. Acesso em 12/08/2014.

PEREIRA, R. Meio Ambiente. **Portal Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 06 jun. 2016. Disponível em: <<https://portal.bio.fiocruz.br/pessoas/conteudo/meio-ambiente/meio-ambiente>>. Acesso em 10/06/2016.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry** v. 83, p. 346-356, 1977.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, p. 201-220, 1979.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods in Enzimology**, v. 91, p.95-119, 1983.

SANTOS, F. R. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012

SANTOS, M.; SOUZA, M. A. A.; SILVEIRA, M. L. (Orgs.). **Territorio, Globalização e Fragmentação**. 4.Ed. São Paulo: Hucitec, 1998. p.18.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. Ed.Trad. de Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Ed. Cengage Learning, 2008.

SILVA JÚNIOR, J. G., **Cromatografia de Proteínas - Guia teórico-prático**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A. (BE). **Composição da vacina compreendendo um antígeno conjugado a polissacarídeo adsorvido por sobre fosfato de alumínio**. BR n. PI 9609414-1 A, 19 jun. 1996, 18 maio 1999.

SMITH P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, n. 150, p.76-85, outubro, 1985. (Erratum in: **Analytical Biochemistry**, n. 163, p. 279, maio 1987).

THERMO SCIENTIFIC. **Pierce protein Assay technical handboook**. Version 2, 2010. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf>>. Acesso em 05/08/2014.

UCLAF, R. (FR). BROSSARD, et al. **Novel polysaccharide extracts and method of use**. USP n. 4210641, 20 outubro 1978, 01 julho 1980.

WILSON, K.; WALKER, J.M. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7. Ed. New York: Cambridge University Press, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines.** Geneva, Switzerland. 2000.

Disponível em:

<[http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO\\_TRS\\_897\\_A1.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO_TRS_897_A1.pdf)>. Acesso em 03/10/2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A Meningococcal conjugate vaccines.** Geneva, Switzerland. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for the WHO 1st International Standard for Haemophilus influenzae type b polysaccharide.** In: Expert Committee On Biological Standardization. Geneva, Switzerland. 2014. Disponível em:

<[http://www.who.int/biologicals/bs\\_2239\\_2ndis-prp-ecbs\\_report-11june2014-final.pdf](http://www.who.int/biologicals/bs_2239_2ndis-prp-ecbs_report-11june2014-final.pdf)>. Acesso em 03/10/2014.

ZAIA, D. A. M. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, São Paulo, v 21, n. 6, p. 787-793. 1998.

Disponível em:

<[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol21No6\\_787\\_v21\\_n6\\_%2819%29.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol21No6_787_v21_n6_%2819%29.pdf)>. Acesso em 12/08/2014.