

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

Joyce Alves da Silva

**CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS  
INATIVADAS: ESTUDO DA DECOMPOSIÇÃO DA BETAPROPIOLACTONA EM  
SOLUÇÃO AQUOSA E NA PRESENÇA DOS TAMPÕES HEPES E TRIS**

Rio de Janeiro

2015

Joyce Alves da Silva

**CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS  
INATIVADAS: ESTUDO DA DECOMPOSIÇÃO DA BETAPROPIOLACTONA EM  
SOLUÇÃO AQUOSA E NA PRESENÇA DOS TAMPÕES HEPES E TRIS**

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

Orientadores: Kátia Christina Leandro  
Josino Costa Moreira

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte  
Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Silva, Joyce Alves da

Contribuição para o Controle da Qualidade de vacinas inativadas: estudo da decomposição da betapropiolactona em solução aquosa e na presença dos tampões HEPES e TRIS./ Joyce Alves da Silva – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

69 f.: il., tab.

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

Orientadores: Kátia Christina Leandro, Josino Costa Moreira

1. Produção de Substâncias, Produtos e Materiais. 2. Controle de Qualidade. 3. Vacinas Atenuadas. 4. Vacina contra Febre Amarela. 5. Propiolactona. 6. Cromatografia Líquida. I. Título

Contribution to the control of vaccines inactivated quality: breakdown of study  
betapropiolactona solution and presence of caps Hepes and Tris



Joyce Alves da Silva

**CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS  
INATIVADAS: ESTUDO DA DECOMPOSIÇÃO DA BETAPROPIOLACTONA EM  
SOLUÇÃO AQUOSA E NA PRESENÇA DOS TAMPÕES HEPES E TRIS**

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

Aprovado em 28 / 09 / 2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Julio Cesar de Faria Alvim Wasserman (Doutor)  
Universidade Federal Fluminense

---

Claudia Maria da Conceição (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Katia Christina Leandro (Doutora) – Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dr. Josino Costa Moreira (Doutor) – Orientador  
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

*Dedico este trabalho ao meu pai Sérgio Roberto,  
a Cristiane Bispo e a Magali Lima.  
(in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me trazer até aqui superando todas as dificuldades.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Katia Cristina Leandro, por acreditar em mim, pelas palavras de apoio e incentivo em todos os momentos. Minha eterna gratidão!

Ao meu orientador Dr. Josino Costa Moreira por acreditar no trabalho;

Ao Dr. André Luís Mazzei Albert pela fundamental colaboração, seus conhecimentos de química e a descontração nos momentos de desânimo. Minha eterna gratidão!

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

A Bio Manguinhos pelo fornecimento das soluções virais.

Ao Laboratório de RMN de Farmanguinhos, em especial a Eliane, pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos novos amigos que o INCQS me deu, Patrícia Condé, Renata Medeiros e José Luís, não sei como seria sem o apoio de vocês!

Aos velhos amigos da UEZO Antônio Marcos, Bruno, Thiago, Vanessa, Samir, Francisco e Lelek pelos momentos de descontração, almoços, cafés e força.

Aos funcionários da biblioteca e secretárias da pós-graduação, agradeço pela atenção e apoio.

A minha família, minha mãe Wandecy e meu irmão Adilson pelo amor incondicional. Amo vocês!

Sem sacrifício não há vitória.

## RESUMO

A vacina contra febre amarela utilizando o vírus atenuado apresenta um histórico de segurança e eficácia, no entanto os relatos esporádicos de eventos adversos em indivíduos saudáveis e a contra indicação da imunização em indivíduos imunocomprometidos, incentivam o desenvolvimento de pesquisas em prol de uma formulação utilizando o vírus inativado. Dentre as formas de inativação viral, a inativação química utilizando a betapropiolactona é a mais imunogênica. Para vacinas já disponíveis no mercado que utilizam esta forma de inativação órgãos internacionais especificam limites residual abaixo de 25 nanogramas por 0,5 mL, em função do potencial cancerígeno da BPL. Dessa forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de metodologia analítica sensível para a detecção do residual da BPL na vacina contra a Febre Amarela. No presente trabalho foram desenvolvidas metodologias utilizando a CGAR e CLAE com diferentes detectores e a escolha da metodologia mais adequada foi auxiliada pela espectroscopia de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ). O método proposto para o estudo da BPL nas soluções virais em meio aquoso e tampão TRIS e HEPES foi a CLAE-UV em fase reversa, coluna C18, comprimento de onda 195 nm e fase móvel composta de solução de ácido fórmico 0,1% pH 2,5: Acetonitrila (60:40). Em 105 minutos o residual de BPL em tampão HEPES foi indetectável e nos demais meios testados até 150 minutos ainda foi possível detectar sinal relativo à molécula. A BPL se decompôs em meio aquoso a  $4^{\circ}\text{C}$  seguindo um modelo de pseudo primeira ordem. Em meio aquoso a  $20^{\circ}\text{C}$  e em tampão TRIS, o decaimento ocorreu seguindo o modelo de pseudo segunda ordem. Em tampão HEPES as reações ocorreram rapidamente impossibilitando a determinação da cinética. A mudança nos modelos de decaimento para a BPL a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$  confirmou experimentalmente a grande influência que a temperatura exerce sobre as reações com BPL e a diferença observada no comportamento da molécula nos dois tampões estudados confirmou a que natureza dos nucleófilos modifica a estabilidade da molécula. Os resultados revelaram que o método proposto é promissor para uma avaliação semi quantitativa da BPL nas soluções virais, além de contribuir na investigação do comportamento da BPL na presença de nucleófilos. Para tal, o método precisa ser otimizado e validado para uso em rotina de Controle da Qualidade da produção de vacina inativada contra o vírus da febre amarela de forma a garantir a segurança da vacina a ser oferecida à população.

**Palavras-chave:** CLAE-UV, residual, Betapropiolactona

## ABSTRACT

The vaccine against yellow fever using the attenuated virus has a history of safety and efficacy, however sporadic reports of adverse events in healthy individuals and the contraindication of immunization in immunocompromised individuals, encourage the development of research in favor of a formulation using the inactivated virus. Among the forms of viral inactivation, chemical inactivation using betapropiolactone is the most immunogenic. For vaccines already available on the market that use this form of inactivation international agencies specify residual limits below 25 nanograms per 0.5 ml, depending on the carcinogenicity of betapropiolactone. Thus, it is fundamental to the development of sensitive analytical methodology for the detection of residual betapropiolactone of the vaccine yellow fever. In this work were developed methodologies using capillary GC and HPLC with different detectors and the choice of the most appropriate methodology was aided by NMR spectroscopy of hydrogen ( $^1\text{H}$ ) and carbon ( $^{13}\text{C}$ ). The method proposed for the betapropiolactone study of the viral solutions in aqueous and TRIS and HEPES buffer was the HPLC-UV reverse phase C18 column, wavelength 195 nm and mobile phase was formic acid 0.1% pH 2.5: acetonitrile (60:40). In 105 minutes the residual betapropiolactone. In HEPES buffer was undetectable and other means tested up to 150 minutes it was still possible to detect signal on the molecule. The betapropiolactone decomposed in aqueous medium at  $4^\circ\text{C}$  following a pseudo-first order model. In aqueous medium at  $20^\circ\text{C}$  and TRIS, the decay occurred following the pseudo second-order model. In HEPES reactions occurred quickly making it impossible to determine the kinetics. The change in decay models for betapropiolactone to  $4^\circ\text{C}$  and  $20^\circ\text{C}$  experimentally confirmed the great influence that the temperature has on the reaction betapropiolactone and difference observed in the molecule of the behavior in the two buffers studied confirmed that the nature of the nucleophiles modifies the stability of molecule. The results revealed that the proposed method is promising for a semiquantitative evaluation of BPL in viral solutions and contribute to the investigation of betapropiolactone behavior in the presence of nucleophiles. To do this, the method must be optimized and validated in order to be used in routine Quality Control of production of an inactivated vaccine against the virus of yellow fever to ensure the safety of the vaccine to be offered to the population.

Keywords:, HPLC- UV, residual, Betapropiolactone

## LISTA DE SIGLAS

- $^{13}\text{C}$  - carbono  
 $^1\text{H}$ - hidrogênio  
3-HPA - Ácido 3- Hidroxiproiônico  
ACRV - Áreas com recomendação de vacina  
Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ASRV- Áreas sem recomendação de vacina  
BPL - betapropiolactona  
CDC - Código de Defesa do Consumidor  
 $\text{CDCl}_3$  - Clorofórmio deuterado  
CGAR - Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
 $\text{D}_2\text{O}$  - Água deuterada  
ECD - Detector de captura de elétrons ou *electron-capture detector*  
FDA - *Food and Drug Administration*  
FID - *Flame ionization detector*  
Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz  
HEPES - N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid  
HIV - Vírus da Imunodeficiência humana  
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
MS - Espectrômetro de massas ou *mass spectrometer*  
NaCl - Cloreto de Sódio  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PIN- Programa Nacional de Imunizações  
RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TCD - Detector de condutividade térmica ou *thermal conductivity detector*  
TR - Tempo de retenção  
TRIS - Tri-hidroximetil-aminometano  
UE - Farmacopeia Europeia  
VLPS- *Virus like particles*  
WHO - World Health Organization

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Preparo das amostras para espectroscopia de RMN.....	39
Tabela 2:	Resumo das equações dos modelos cinéticos testados no experimento.....	40
Tabela 3:	Condições cromatográficas utilizadas na CGAR.....	41
Tabela 4:	Condições cromatográficas para CLAE-UV, em modo isocrático e em modo gradiente.....	49
Tabela 5:	Gradiente utilizado na CLAE-UV.....	49
Tabela 6:	Tempos de detecção do residual de BPL nos diferente meios estudados.....	57
Tabela 7:	Parâmetros de regressões lineares determinados empregando os modelos cinéticos de ordem zero, primeira e segunda ordem.....	59

## LISTA DE FIGURA

Figura 1:	Estrutura molecular da Betapropiolactona.....	28
Figura 2:	Estrutura molecular do Ácido 3-hidroxipropionico.....	28
Figura 3:	Possíveis rotas de reação da BPL com nucleófilos conduzindo a produtos (I) acilados e (II) alquilados.....	29
Figura 4:	Cromatograma da BPL solubilizada em clorofórmio, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3.....	42
Figura 5	Cromatograma do 3- HPA em água, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3.....	43
Figura 6:	Cromatogramas do 3- HPA (A), da BPL diluída em clorofórmio (B) e da BPL diluída em água a 4°C (C), utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3.....	44
Figura 7:	Cromatograma da Solução controle tampão HEPES, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3.....	45
Figura 8:	Cromatograma da Solução inativada em tampão HEPES, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3.....	45
Figura 9:	Cromatograma da Solução controle tampão TRIS, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3 .....	46
Figura 10:	Cromatograma da Solução inativada em tampão TRIS, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3 .....	46
Figura 11:	Cromatograma da BPL diluída em água analisa por CLAE/MS.....	48
Figura 12:	Cromatogramas da BPL utilizando CLAE em modo gradiente(A) e modo isocrático (B), utilizando as condições cromatográficas descritas na tabela 4.....	50
Figura 13:	Sinais característicos da estrutura química da betapropiolactona diluída em CDCl <sub>3</sub> , espectros de RMN- <sup>1</sup> H (A), RMN- <sup>13</sup> C (B) .....	51
Figura 14:	Sinais característicos da estrutura química do 3-HPA, espectro de RMN- <sup>1</sup> H (A), de RMN- <sup>13</sup> C (B) e expansão do	52

	espectro de RMN- <sup>1</sup> H (0,0 - 4,0 ppm) do 3-HPA (C).....	
Figura 15:	Sinais característicos da estrutura química do tampão HEPES, espectro de RMN- <sup>1</sup> H.....	53
Figura 16:	Espectro de RMN - <sup>1</sup> H da reação tampão HEPES + H <sub>2</sub> O +BPL.....	53
Figura 17	Expansão do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2,4 -4,0 ppm) da reação HEPES + H <sub>2</sub> O +BPL.....	53
Figura 18:	Sinais característicos da estrutura química do tampão HEPES, espectro de RMN- <sup>13</sup> C.....	54
Figura 19:	Sinais característicos da estrutura química da reação tampão HEPES + H <sub>2</sub> O + BPL, espectro de RMN- <sup>13</sup> C .....	54
Figura 20:	Sinais característicos da estrutura química do 3-HPA, espectro de RMN- <sup>13</sup> C.....	54
Figura 21:	Sinais característicos da estrutura química do tampão TRIS, espectro de RMN- <sup>1</sup> H.....	55
Figura 22:	Expansão do espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2,5 - 4,5) do tampão TRIS + H <sub>2</sub> O + BPL.....	55
Figura 23:	Sinais característicos da estrutura química do tampão TRIS, espectro de RMN- <sup>13</sup> C.....	56
Figura 24	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C do tampão TRIS + H <sub>2</sub> O + BPL.....	56
Figura 25:	Comportamento da BPL (300mgL <sup>-1</sup> ) em meio aquoso a 4°C e 20°C, em tampão HEPES e em tampão TRIS a 4°C em função do tempo de reação.....	58
Figura 26:	Cinética da reação da BPL (300mgL <sup>-1</sup> ) em tampão TRIS a 4°C.....	60
Figura 27:	Cinética da reação da BPL (300mgL <sup>-1</sup> ) em meio aquoso a 4°C.....	60
Figura 28:	Cinética da reação da BPL (300mgL <sup>-1</sup> ) em meio aquoso a 20°C.....	61

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	FEBRE AMARELA.....	17
1.2	FEBRE AMARELA NO BRASIL.....	20
1.3	VACINA ANTIAMARÍLICA.....	23
1.4	EVENTOS ADVERSOS DA VACINA ATENUADA ANTIAMARÍLICA.....	24
1.5	VACINAÇÃO DE IMUNOSSUPRIMIDOS.....	25
1.6	DESENVOLVIMENTO DE VACINA INATIVADA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	26
1.7	BETAPROPIOLACTONA.....	27
1.8	INATIVAÇÃO VIRAL PELA BETAPROPIOLACTONA.....	28
1.9	O CONTEXTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	30
2.0	O INCQS E O CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS	31
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	33
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	MATERIAL.....	34
3.1.1	Soluções Virais.....	34
3.1.1.1	Composição da solução viral em tampão HEPES.....	34
3.1.1.2	Composição da solução viral em tampão TRIS.....	34
3.2	REAGENTES.....	34
3.3	EQUIPAMENTOS.....	35
3.4	METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA BPL.....	35
3.4.1	Desenvolvimento de metodologia analítica por CGAR.....	36
3.4.1.1	Preparo das amostras .....	36

3.4.2	Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE.....	37
3.4.3	Análise por espectroscopia de RMN .....	38
3.4.3.1	Reação da BPL em H <sub>2</sub> O.....	39
3.4.3.2	Reação da BPL em tampão HEPES.....	39
3.4.3.3	Reação da BPL em tampão TRIS.....	40
3.5	ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DA BPL EM DIFERENTES MEIOS.....	40
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	41
4.1	METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE BPL.....	41
4.1.1	Desenvolvimento de metodologia analítica por CGAR.....	41
4.1.2	Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE.....	47
4.1.3	Análise por espectroscopia de RMN.....	51
4.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE DE BPL EM DIFERENTES MEIOS.....	56
5	<b>CONCLUSÕES.....</b>	62
6	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	64
	<b>REFERÊNCIA .....</b>	65

## 1 INTRODUÇÃO

A febre amarela é uma doença transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, se apresenta como uma importante causa de morbidade e letalidade em vastas regiões tropicais da América do Sul e da África. No século XVII, a doença foi responsável pelo extermínio de milhares de vidas em epidemias urbanas. Na atualidade, embora exista uma vacina eficaz contra a febre amarela, esta doença ainda se apresenta como um problema de Saúde Pública, especificamente nas regiões em que a temperatura é mais quente e as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação dos vetores (MONATH, 2005).

Em 1930 a vacina contra a febre amarela contendo flavivírus atenuados foi autorizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta vacina é utilizada até hoje, porém a ocorrência de casos de eventos adversos associados ao vírus vacinal da febre amarela, cepa 17D e subcepa 17DD fomentam o desenvolvimento de pesquisas para a produção de uma vacina inativada contra esse vírus (MARTIN *et al.*, 2001; STRUCHINER *et al.*, 2004; OMS, 2004; MONATH, 2005).

As vacinas virais podem ser inativadas por métodos físicos como calor e irradiação ultravioleta, por métodos químicos utilizando agentes como formaldeído e betapropiolactona (BPL) ou de forma sinérgica utilizando os dois métodos. Dentre as formas de inativação a química utilizando a BPL é mais eficiente por modificar principalmente o DNA viral. Embora, o uso da BPL apresente imunogenicidade comprovada (METZ, B. UITTENBOGAARD, J., HOOGERHOUT, 2011), a molécula é um dos produtos químicos considerados cancerígenos ocupacionais pela *Occupational Safety and Health Administration* e não apresenta, para vacina contra a febre amarela, um limite de exposição estabelecido (RACE *et al.*, 1995).

Não existe um consenso quanto ao limite máximo do residual de BPL aceito nas vacinas inativadas. Atualmente a faixa de BPL utilizada nos processos industriais é de 0,025 a 1%. Embora a OMS e Farmacopeia Europeia (UE) recomendem um ajuste fino (estreitamento) dessa faixa, a compreensão limitada da relação entre a massa molecular necessária para alcançar a perda do poder infeccioso e a

capacidade da BPL para modificar proteínas limitam a determinação desse ajuste (LAMBERT *et al*, 2014).

Existem, na literatura, estudos visando a determinar a completa supressão da infectividade viral pela BPL (ENGVALL & PERLMANN, 1971), porém não foram encontrados estudos sobre a determinação do resíduo deste agente inativante potencialmente cancerígeno nas vacinas (KAMARAJ *et al.*, 2008).

### 1.1 FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença que constitui a febre hemorrágica viral original, tratando-se da primeira descrita no mundo e a que mais provoca temor na sociedade moderna (VASCONCELOS, 2013).

O vírus da febre amarela pertence ao grupo dos arbovírus (do inglês *arthropod borne virus*). É um vírus de RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases de comprimento. Constitui o gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae (do latim *flavus* = amarelo). O vírus pertence ao mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis por doença no homem, entre os quais o Dengue, o *West Nile*, o Rocio e a encefalite de *St. Louis*. Embora apenas um sorotipo do vírus amarelado seja reconhecido, há pequenas alterações genéticas entre as cepas existentes na América e na África que permitem atualmente caracterizar dois e cinco genotipos, respectivamente, não se sabendo qual deles é o mais patogênico (VASCONCELOS, 2013).

Mais de 90% dos casos de febre amarela anualmente notificados à OMS ocorrem na África, o que corresponde a cerca de 5000 casos anuais. Na América do Sul estima-se a ocorrência de 300 casos anuais. Até recentemente não se sabia se o vírus já existia na América antes do comércio de escravos vindos da África, mas atualmente acredita-se que o mesmo tenha se originado na África, pois pesquisas utilizando ferramentas moleculares indicam que as amostras de febre amarela da América perderam parte de uma sequência repetitiva do genoma na região não

codificante, o que não ocorre nas amostras africanas, inclusive na vacina 17D e na amostra protótipo Asibi da qual derivou a amostra vacinal (VASCONCELOS, 2013).

A resposta à infecção amarílica é ampla e variável. Estima-se que cerca de 90% dos casos com expressão clínica sejam das formas classificadas como leve e com poucos sintomas e somente 10% dos casos sejam das formas graves. Além disso, algumas pessoas desenvolvem quadros assintomáticos. Estas formas assintomáticas, os casos subclínicos e formas leves da doença, costumam ocorrer em crianças de baixa idade cujas mães foram vacinadas e transmitiram (via transplacentária durante a gestação) anticorpos maternos do tipo IgG (VASCONCELOS, 2002). Outros indivíduos desenvolvem formas severas da doença, neste grupo estão incluídas as pessoas nunca vacinadas, portanto completamente indefesas à doença. Estas pessoas desenvolvem quadros clássicos, severos e extremamente graves da enfermidade. Nas formas leves e moderadas, a sintomatologia é indiferenciada, não característica, e se confunde com doenças comuns nas áreas endêmicas, tais como malária, hepatites virais, febre tifoide, mononucleose infecciosa (VASCONCELOS, 2002). Em geral, os sintomas na forma leve se restringem a febrícula ou febre moderada, acompanhada de cefaleia discreta e astenia ou indisposição passageira, por até dois dias quando o paciente se recupera sem sequelas. Na forma moderada, o paciente além desses sintomas pode apresentar náuseas sem vômitos, mialgias, artralguas leves e pelo menos um dos sintomas clássicos da doença a hematêmese (vômito negro), icterícia ou oligúria/anúria por dois a três dias com recuperação completa. Nas formas graves da febre amarela os pacientes apresentam os três sintomas clássicos que caracterizam a falência hepatorenal. O quadro evolui em duas fases ou períodos, com um período de remissão entre as mesmas (VASCONCELOS, 2002). A sintomatologia da forma grave da febre amarela é caracterizada por início abrupto, após um período de incubação médio de 6 dias (período de tempo que vai da picada infectante até o início dos sintomas) e que pode ser de até duas semanas. Inicialmente surge febre elevada, geralmente com redução da pulsação, o que é conhecido como sinal de Faget. Pouco tempo depois surge a cefaleia holocraniana acompanhada de dores

musculares, principalmente nas costas. O quadro se completa com astenia, prostração e náuseas e evolui por 2 a 3 dias. Esse período corresponde ao período prodrômico ou fase infecciosa da enfermidade. Em muitos pacientes, seguindo-se ao período infeccioso há uma fase de remissão que se caracteriza por sensação de melhora e cura iminente que dura de 12 até 48 horas, o estado desses pacientes repentinamente se agrava, com piora de todos os sintomas apresentados e o surgimento de outros, é o início do período de intoxicação, toxêmico ou fase de localização, pois neste período o vírus deixa de circular no sangue, sendo encontrado somente no fígado. Manifestações hemorrágicas podem ocorrer sendo mais frequentes do tegumento, das gengivas e do ouvido (VASCONCELOS, 2002).

Durante anos, acreditou-se que a transmissão da febre amarela ocorria pelo ar. Em 1848, Josiah Clark Nott sugeriu que a febre amarela poderia ser transmitida por mosquitos, mas o defensor, desta ideia foi o médico francês Louis Daniel Beauperthuy que, em 23 de maio de 1854, relatou os fatos relacionados com a transmissão da febre amarela, em artigo publicado na “Gazeta Oficial de Cumaná”, Venezuela (WHO, 2005a). Em 1881, Carlos Finlay, apoiado em várias observações defendeu a mesma teoria, apontando o mosquito *Stegomyia fasciata*, hoje conhecido como *Aedes aegypti*, como causador da febre amarela (FINLAY, 1881). Após a demonstração experimental, em 1901, pela Comissão Reed em Havana de que a febre amarela podia ser transmitida de uma pessoa a outra pelo mosquito *Aedes aegypti*, ficou comprovada a teoria de Finlay (CHIONG, 1989). A divulgação da descoberta desencadeou uma série de campanhas contra o mosquito nos lugares onde a febre amarela era considerada um problema de Saúde Pública. Em Havana, Panamá, Santos, Rio de Janeiro, Equador, Peru, Colômbia, América Central, México e outros centros urbanos foram adotadas medidas de controle contra o mosquito associadas a grandes investimentos em infraestrutura urbana, que determinaram uma redução drástica na ocorrência de casos de febre amarela (WHO, 2003, 2004).

Na África, também foi registrado o isolamento viral a partir de carrapatos *Amblyoma variegatum*, em áreas secas, o que pode indicar o papel secundário dos

insetos hematófagos dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus* na cadeia de transmissão da virose, pois se demonstrou transmissão transovariana e de macacos para macacos (VASCONCELOS, 2013).

Sob o ponto de vista epidemiológico divide-se a febre amarela em urbana e febre amarela silvestre que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores, dos hospedeiros vertebrados e do local de ocorrência (VASCONCELOS, 2013). No ciclo urbano, a febre amarela é transmitida ao homem pelo mosquito doméstico *Aedes*, que se reproduz em águas limpas acumuladas em localidades urbanas. Quando o mosquito é infectado pelo vírus, são necessários 12 a 14 dias para que ele comece a transmitir o vírus para o homem. Já a febre amarela silvestre é uma doença endêmica em macacos, transmitida por mosquitos *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*, que habitam as florestas úmidas. A infecção nestes animais pode ser imperceptível ou grave. A forma silvestre da doença tem sido objeto de intervenções por meio do controle dos mosquitos vetores (GUBLER, 2004; MONATH, 2005).

Atualmente há dois desafios para o controle da febre amarela no Brasil, o primeiro é reduzir a incidência de casos do ciclo silvestre da doença, pois, se tratando de uma zoonose, não é passível de erradicação e o segundo é manter inexistente a incidência de casos do ciclo urbano, ou seja, prevenir a reurbanização da doença. Quanto ao primeiro desafio, há um consenso sobre a necessidade de vacinação de todos os residentes e visitantes de áreas endêmicas. Quanto ao segundo, existe unanimidade no que se refere à necessidade de combater o mosquito *Aegypti*, porém não há consenso a respeito da necessidade de vacinação de toda a população das áreas urbanas infestadas pelo *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus* (TAUIL, 2009).

## 1.2 FEBRE AMARELA NO BRASIL

Os últimos casos urbanos no país foram identificados em 1942. Desde então, os casos relatados da doença têm sido de transmissão por meio do ciclo silvestre. O

Brasil é o país que possui a maior área endêmica de febre amarela silvestre no mundo, seguida pela bacia do rio Congo, na África (TAUIL, 2001; GUBLER, 2004). A área endêmica brasileira inclui 12 estados, sendo eles Acre, Amazonas, Amapá, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nesses estados estão presentes todos os elos da cadeia de transmissão macacos (VASCONCELOS, 2013).

A circulação viral ocorre todos os anos e depende de fatores como o grau de cobertura vacinal da população, taxa de infecção dos mosquitos transmissores, imunidade da população de macacos ao vírus e alterações ambientais como o aumento de intensidade das chuvas. Alguns municípios dos estados da Bahia, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo são considerados áreas de transição. A epizootia estende-se, ainda, aos estados de Minas Gerais e Paraná.

Os últimos registros de casos de febre amarela no Brasil foram os surtos epidêmicos em Minas Gerais em 2001 e 2003. Em janeiro de 2008 foram confirmados casos na Região Centro-oeste, porém não configurou uma epidemia (CAMACHO, 2005).

A febre amarela é doença de notificação compulsória e, como tal, qualquer caso suspeito deve ser imediatamente notificado à autoridade sanitária local, estadual ou nacional, que por sua vez reporta aos organismos internacionais. Posteriormente, caso seja confirmado ou descartado laboratorialmente, a notificação do caso é confirmada e a autoridade nacional confirma ou descarta a notificação à autoridade sanitária internacional (VASCONCELOS, 2002).

É importante destacar que na vigilância da febre amarela, níveis endêmicos e limite máximo esperado perdem relevância nas decisões sobre intervenção, devido à flutuação de número pequeno de casos dispersos em grande extensão territorial que dificulta a caracterização de epidemia. Além disso, considerando a relevância da doença para saúde pública, apenas um caso poderia ser abordado como epidemia potencial ou inicial, com intensificação de medidas de controle pertinentes (CAMACHO, 2005).

Os casos ocorridos em 2008 mostraram uma vigilância atuante e inovadora com notificação e investigação oportuna de casos, e elevação do alerta em áreas do país de onde vem a maior parte dos suscetíveis que se infectam nas regiões endêmicas. A inovação na vigilância da febre amarela tem vindo da detecção de epizootias em primatas que constituem hospedeiros conhecidos da febre amarela silvestre. A vigilância de epizootias permitiu antecipar ações de vacinação de populações das áreas antes que ocorressem casos humanos (CAMACHO, 2005) .

Em 2009, o Ministério da Saúde, baseando-se nas epizootias ocorridas em 2008 e 2009, dividiu as regiões consideradas para a transmissão em áreas com recomendação de vacina (ACRV), anteriormente chamadas de endêmicas e de transição e áreas sem recomendação (ASRV), antes conhecidas como indenes. A ACRV compreende as regiões Norte e Centro-oeste, os estados do Maranhão e de Minas Gerais e parte de São Paulo, Piauí, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (OLIVEIRA, *et. al.* 2013).

A suscetibilidade da doença é geral, sem etnia ou faixa etária com maior ou menor suscetibilidade ao vírus. Os indivíduos mais acometidos são homens jovens, pela maior exposição ao agente transmissor. O período médio de incubação é de 3–6 dias (OLIVEIRA, *et. al.* 2013).

Os surtos da doença ocorrem a cada 5–7 anos e não há tratamento específico. Quanto às medidas gerais para evitar a forma urbana doença além do combate ao mosquito *Aedes aegypti* estão a coleta de lixo, suprimento de água adequados, uso de larvicidas, educação em saúde por parte das instituições governamentais, aliados aos cuidados da população, que para diminuir a transmissão deve evitar situações em que a água fique parada, como em vasos de plantas, calhas ou piscinas não tratadas. Deve-se evitar viagens a áreas silvestres de regiões com recomendação de vacina em casos em que não se tenha feito a imunização 10 dias e por 10 anos em relação à viagem, pois a vacina antiamarílica é a principal forma de prevenção da doença (OLIVEIRA *et. al.* 2013).

### 1.3 VACINA ANTIAMARÍLICA

Não existe medicamento específico e eficaz para o tratamento da febre amarela e os exames laboratoriais que confirmam a infecção demoram em média uma semana. O tratamento de suporte deve ser iniciado imediatamente a suspeita da infecção, sendo aconselhável a internação do paciente com as formas graves da doença. Como o tratamento medicamentoso é voltado para combater os sintomas da patologia, a principal forma de prevenção contra febre amarela é a imunização (VASCONCELOS, 2002).

A vacina 17D encontra-se disponível no Brasil desde 1937, atualmente é produzida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), que é o maior produtor da vacina no mundo. Desde que foi autorizada no país mais de 500 milhões de pessoas foram imunizadas. A vacina considerada uma das mais eficazes e seguras vacinas do mundo (VASCONCELOS, 2002). Com relação aos ensaios preconizados, na Farmacopeia Brasileira, disponíveis para o controle da qualidade da vacina atenuada contra febre amarela estão o teste de identificação, de umidade residual, de endotoxina bacteriana, de esterilidade, de ovoalbumina, de dosagem e de termoestabilidade (BRASIL, 2010).

A vacina oferece proteção por pelo menos 10 anos e até mesmo para a vida toda. No período de 30 dias, após a vacinação mais de 90% dos vacinados desenvolvem anticorpos contra a febre amarela e cerca de 98%–100% dos indivíduos tornam-se imunizados. A vacinação deve ser realizada a partir dos 9 meses de idade nas ACRV e em situações de epidemia ou surto, deve ser feita a partir de 6 meses de idade, segundo o Ministério da Saúde (OLIVEIRA *et. al.* 2013).

A cepa 17D original foi desenvolvida a partir de 176 passagens da cepa selvagem Asabi em tecidos de camundongos e galináceos. As vacinas utilizadas atualmente são derivadas de duas subcepas (17DD e 17D204) obtidas a partir de 287–289 e 235–240 passagens, respectivamente. O objetivo das passagens é diminuir a virulência. Após a imunização, uma baixa viremia é detectada em metade dos vacinados. Há rápida indução de resposta humoral e a imunoglobulina M (IgM)

pode ser detectada em 7–10 dias. A cepa 17D é um potente indutor de resposta T citotóxica CD4+ e CD8+. O sistema imune inato também é envolvido, pois a cepa 17D replica-se de forma mínima em células dendríticas, podendo levar à apoptose das mesmas (MONATH, 2008 e OLIVEIRA *et al.* 2013).

#### 1.4 EVENTOS ADVERSOS DA VACINA ATENUADA ANTIAMALÁRICA

O estado de imunidade do indivíduo pode ser induzido pelo uso de variados tipos de vacinas. Em relação às vacinas virais, essas podem conter vírus atenuados, inativados, partículas semelhantes a vírus (do termo em inglês “Virus Like Particles” (VLPs) ou apenas subunidades protéicas. Tanto as vacinas inativadas como as atenuadas podem apresentar eventos adversos. As vacinas inativadas podem apresentar toxicidade do agente inativante e a curta duração da resposta imunológica (BUDOWSKY *et al.*, 1991) e vacinas atenuadas, podem gerar microorganismos mais infecciosos que os vírus inoculados (WHO, 2004).

Durante décadas, a vacina 17D atenuada contra febre amarela mostrou-se segura, exceto por raros casos de encefalite pós-vacinal que ocorreram principalmente em crianças menores de 9 meses de idade. No entanto, na última década foi reconhecido outro efeito colateral grave, a doença multi-sistêmica que é indistinguível da febre amarela selvagem. No Brasil, ocorreram 4 casos (idade de 4 a 22 anos) e todos morreram entre 4 a 6 dias de doença. Nos Estados Unidos, a incidência de efeitos sistêmicos graves é maior em indivíduos maiores de 60 anos (MOTA *et al.*, 2009).

Outros eventos adversos relatados podem ser locais como dor localizada, endurecimento, eritema, calor, de natureza neurológica como mielite, alteração de status mental, déficits focais, parestias, vertigem, cefaleia ou eventos multi-sistêmicos como mialgia, artralgia, rabdomiólise, aumento de transaminases, náuseas, vômitos, diarreia. Também podem ocorrer eventos relacionados a reações de hipersensibilidade como exantema, urticária, febre, anafilaxia, asma ou angioedema.

Esses eventos costumam ocorrer entre 5 e 7 dias após vacinação, período em que ocorre uma viremia transitória. As contraindicações ao uso da vacina são alergia à proteína do ovo, gestação e imunodepressão congênita ou adquirida. Dentre os casos de imunossupressão, incluem-se aqueles pacientes em uso de imunossupressores, pelos mais diversos motivos (MOTA *et al*, 2009).

De acordo com os dados do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (PIN) do Ministério da Saúde, houve 1.994 eventos adversos reportados no período de 2000–2008, quando 101.564.083 doses da 17DD foram aplicadas. Esses eventos ocorrem mais frequentemente após a administração da primeira dose. A cada milhão de vacina houve 0,023 casos de choque anafilático, 9 casos de hipersensibilidade e 0,84 episódios de encefalite. Foram identificados 26 casos de doença viscerotrópica. Nesse período, foi possível observar aumento das publicações sobre eventos adversos no país (OLIVEIRA *et. al.* 2013 e MOTA *et al*, 2009).

## 1.5 VACINAÇÃO DE IMUNOSSUPRIMIDOS

Existem diversos tipos de comprometimento da imunidade humoral e celular, algumas condições são bastante raras, como a imunodeficiência combinada grave, outras, tornam-se cada vez mais frequentes, como é o caso das imunodeficiências associadas à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), ao uso de corticosteroides ou de drogas imunossupressoras para terapêutica de indivíduos portadores de neoplasias ou submetidos a transplantes. Nos países mais pobres, a desnutrição grave ainda é um importante problema de saúde pública e a frequência de crianças com baixo peso de nascimento é três vezes maior que a encontrada em países ricos. Nas nações mais ricas observa-se que aumenta, a cada ano, o número de idosos. Tanto a desnutrição (pré e pós-natal) como a idade avançada estão associadas à diminuição da imunidade celular. Além disso, doenças crônicas, tais como diabetes, cardiopatias, mucoviscidose, nefropatias crônicas, cirrose hepática,

alcoolismo e anemia falciforme também podem comprometer a imunidade (BRICKS, 1998).

O Ministério da Saúde ainda não estabeleceu normas a respeito da indicação da vacina contra febre amarela em pacientes infectados pelo HIV, no entanto, a recomendação é que indivíduos com grau severo de imunodeficiência devem evitar se locomover para regiões de alto risco afim de evitar a vacina. Em mulheres grávidas a vacina não acarreta risco para a gestante e situações em que o risco de adquirir a doença é maior (para a gestante e/ou para o feto) do que o risco potencial da vacina para o feto, a vacina pode ser aplicada em gestantes (SUCCI & FARHAT, 2006).

#### 1.6 DESENVOLVIMENTO DE VACINA INATIVADA CONTRA A FEBRE AMARELA

Os relatos de casos esporádicos de eventos adversos e a necessidade de proteger pessoas imunocomprometidas contra febre amarela incentivam pesquisas no intuito de desenvolver uma vacina do vírus inativado, oferecendo benefícios substanciais a população (JONKER *et al*, 2013). Recentemente, MONATH e colaboradores (2010) mostraram a eficácia de uma nova vacina, contra febre amarela inativada, que provoca uma resposta imunológica protetora em indivíduos saudáveis de 18 a 50 anos de idade. Os eventos adversos foram leves e comparáveis à vacinação com a vacina viva atenuada. Em 2008, GASPAR e colaboradores mostraram resultados promissores com a vacinação da cepa 17D inativada por pressão hidrostática. Em 2011, SCHAFER e colaboradores desenvolveram uma vacina contra febre amarela constituída de um vírus codificado através de um precursor da proteína de membrana. No entanto, estas vacinas inativadas aguardam melhor avaliação em ensaios clínicos e devem ser investigadas principalmente em indivíduos imunocomprometidos (JONKER *et al*, 2013).

Segundo as recomendações internacionais o Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) vem trabalhando no desenvolvimento de uma vacina a partir do vírus inativado.

Vacinas virais podem ser inativadas por métodos físicos como calor e irradiação ultravioleta, químico como formaldeído e betapropiolactona ou de forma sinérgica pelos dois métodos. Quanto às inativações por métodos químicos, o uso do formaldeído induz reações não só com os grupos aminas e amidas das proteínas, como também, com os grupos amina não envolvidos em pontes de hidrogênio, nas bases purínicas e pirimidínicas do ácido nucléico. É descrita como uma reação de primeira ordem, onde a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da substância que está reagindo (HENNESSEN, 1981). Existem questionamentos quanto ao uso do formaldeído como agente inativante de vírus para a produção de vacinas devido a sua toxicidade (MOOSBRUGGER, 1948; GRAVES, 1963). Os métodos moleculares de análises, introduzidos nos anos 1970, provaram que os surtos na França (1981) e em outros países da Europa Ocidental, (1980) foram associados a vacinas inativadas de forma inadequada. Porém, o formaldeído continua sendo utilizado como agente inativante (BAHNEMANN, 1990). Assim, outros métodos de inativação devem ser testados como o uso da betapropiolactona, do glutaraldeído e da pressão hidrostática. A inativação com a betapropiolactona modifica principalmente o DNA viral, apresenta maior imonogenicidade e a vantagem de ser completamente hidrolisada a um produto não tóxico, o ácido 3 hidroxipropiônico, encontrado normalmente no corpo humano como produto do metabolismo (RACE *et al.*, 1995 e METZ, UITTENBOGAARD, HOOGERHOUT, 2011).

## 1.7 BETAPROPIOLACTONA

A BPL é um composto orgânico da família das lactonas, altamente planar, constituído por um anel. Possui fórmula molecular  $C_3H_4O_2$ , massa molar 72,06 g/mol e densidade 1.146 g/cm<sup>3</sup>. Apresenta-se como um líquido límpido e incolor, com um odor ligeiramente doce, muito solúvel em água e miscível com etanol, acetona, éter dietílico e clorofórmio. É um dos produtos químicos considerados cancerígenos ocupacionais pela *Occupational Safety and Health Administration*, apesar de não ter

um limite de exposição permitido estabelecida. A BPL (figura 1), sofre hidrólise dando origem ao ácido 3- hidroxipropiônico (figura 2).

Figura 1: Estrutura molecular da Betapropiolactona

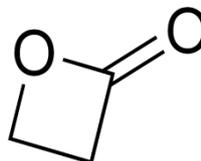
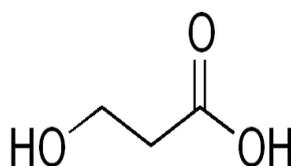


Figura 2: Estrutura molecular do Ácido 3-hidroxipropiônico



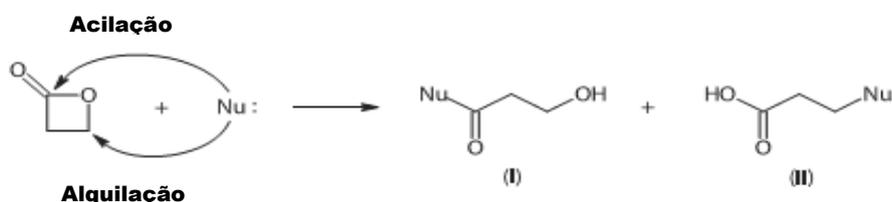
A BPL é a lactona mais importante produzida comercialmente. É preparada pela condensação de cetona com formaldeído na presença de zinco ou cloreto de alumínio. Apresenta alta reatividade, pois sua estrutura é um anel instável. A BPL um agente nucleofílico alquilante ou acilante reage rapidamente com nucleófilos como acetato, halogeno, tiocianato, tiosulfato, hidroxila e sulfidrilas (FISHBEIN *et. al*, 1970). Ela também pode ser utilizada como desinfectante para esterilizar o plasma sanguíneo, instrumentos cirúrgicos, enzimas e também como intermediário na síntese de outros compostos químicos (FISHBEIN *et. al*, 1970).

## 1.8 INATIVAÇÃO VIRAL PELA BETAPROPIOLACTONA

As primeiras tentativas de desenvolver uma vacina de febre amarela com vírus inativado ocorreram em 1928, estas não obtiveram êxito devido à inativação viral incompleta (MONATH, 2010).

A BPL é amplamente utilizada para inativação de vírus e preparação de vacina viral, embora a natureza exata de suas reações com os componentes virais não esteja totalmente elucidada. Poucos artigos estudam as reações químicas entre esse agente e os nucleófilos presentes na solução viral (água, sais inorgânicos, aminas, álcoois, tióis, ácidos carboxílicos). As reações de BPL são tipicamente SN2 em que a razão de consumo depende da concentração do nucleófilo. A BPL pode reagir com nucleófilos por dois caminhos resultando em produtos alquilados ou acilados (figura 3).

Figura 3: Possíveis rotas de reação da BPL com nucleófilos conduzindo a produtos (I) acilados e (II) alquilados



Nucleófilos fortes como grupo amino (RNH<sub>2</sub>) reagem com carbono acil dando origem a grupos alquilados, enquanto nucleófilos fracos como grupos tióis (RSH) dão origem a grupos acilados. A força do nucleófilo é sempre influenciada pelo meio reacional. Por exemplo, ligações de hidrogênio podem aumentar a força do grupo amino ou tióis resultando numa maior tendência a formar derivados alquilados. O mesmo é válido para água que se torna um nucleófilo mais forte quando desprotonada (METZ, UITTENBOGAARD, HOOGERHOUT, 2011).

Não é toda BPL introduzida ao meio reacional que irá conduzir a inativação do vírus, parte das moléculas de BPL inseridas no meio reagem com água e os demais nucleófilos do meio dando origem aos compostos não tóxicos (JADI *et al.* 2011 e GRESHAM *et al.*, 1948). A inativação do vírus ocorre somente após a reação da BLP com os constituintes virais como o DNA, RNA e proteínas. Certo número de modificações químicas induzidas pela BPL a esses constituintes foi elucidada,

porém a natureza de todas as possíveis reações ainda é amplamente desconhecida (METZ, UITTENBOGAARD, HOOGERHOUT, 2011).

Não foram encontradas recomendações nacionais ou internacionais quanto ao limite aceitável de BPL em soluções virais de 17DD inativadas. No entanto, em 2004 a *World Health Organization* (WHO) recomendou, para vacina antirábica inativada, que o residual da BPL seja indetectável no final a granel. Em 2009, a *Food and Drug Administration* (FDA) descreveu para a vacina inativada contra o vírus influenza que cada dose de 0,5 mL deve conter uma quantidade menor que 25 nanogramas de BPL. Desta forma, o desenvolvimento de uma metodologia sensível para a determinação do residual de BPL na vacina viral inativada contra a febre amarela visa contribuir para a segurança da mesma.

## 1.9 O CONTEXTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Lei nº 8.080 de 1990, regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS) define Vigilância Sanitária como “conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviços de interesse da saúde...” (SILVA, 2000).

As conquistas sociais recorrentes da promulgação da Constituição Federal, surgiu o Código de Defesa do Consumidor (CDC), Lei nº 8.079, de 1990, que, busca a proteção da saúde do indivíduo contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O CDC traduz o entendimento social de que a qualidade e o risco são responsabilidades do fabricante (SILVA, 2000).

Sendo assim, as ações da vigilância sanitária devem ser tomadas diante de riscos ou eminências de que os mesmos aconteçam, de maneira que, encontradas as causas, as ações ocorram no sentido de evitá-los. Assim, o princípio da precaução é o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária.

As ações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) se dirigem para a existência de risco (ZILDA & COROA, 1998).

A lei 9782 de 27 de janeiro de 1999 dispõe sobre o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Anvisa. De acordo com esta lei, foi definido que a agência teria por finalidade “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras” (PIOVESAN, 2002).

## 2.0 O INCQS E O CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) tem o papel de acompanhar o cenário da vigilância sanitária. Atualmente suas ações tornaram-se referência nacional científicas e tecnológicas, relacionadas ao controle de qualidade de produtos de interesse da saúde. A legislação tornou o INCQS subordinado tecnicamente à Anvisa e, administrativamente, à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (PIOVESAN, 2002).

A fiscalização sanitária requer um laboratório para a avaliação analítica, no qual seja verificada a conformidade dos produtos com normas sanitárias (SILVA, 2000). A legislação estabelece as modalidades de análise como a análise fiscal, análise de controle e análise prévia que devem ser realizadas em laboratórios oficiais.

No escopo do instituto está a análise de alimentos, artigos e insumos para diálise, artigos e insumos para saúde, conjuntos, reagentes e insumos para diagnósticos, cosméticos, medicamentos, produtos biológicos, saneantes domissanitários, hemoderivados e saúde ambiental.

No tocante aos produtos biológicos, soros e vacinas são analisados desde 1983 baseados em normas oficiais nacionais ou internacionais, são analisados

também os protocolos de produção e executados ensaios laboratoriais em lotes de imunobiológicos adquiridos pelo Ministério da Saúde utilizados no Programa Nacional de Imunizações (INCQS, 2015).

Diante da importância das ações de vigilância sanitária, no sentido de garantir que os produtos oferecidos à população não ofereçam riscos nem danos à saúde, verifica-se a potencialidade deste trabalho. Considerando que vacinas são produtos aplicados em pacientes saudáveis, a preocupação e o controle devem ser ainda mais rigorosos, a fim de garantir a segurança dos mesmos. É neste sentido que este trabalho se desenvolve, buscando desenvolver ferramentas que possam garantir ainda mais a segurança das vacinas de febre amarela em desenvolvimento e futuramente comercializadas no Brasil.

Frente a importância do assunto e diante da carência de metodologias relacionadas ao estudo da decomposição da betapropiolactona em soluções virais algumas metodologias serão discutidas neste trabalho, buscando o desenvolvimento de uma metodologia que seja capaz de detectar a presença do residual de BPL e, consequentemente contribuindo para o controle da qualidade vacina inativada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento da BPL em solução aquosa na presença dos tampões HEPES e TRIS em pH 8,5.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desenvolver metodologias por CGAR-FID e CLAE-UV para detecção da BPL em meio aquoso e na presença dos tampões HEPES e TRIS (pH = 8,5);
- Utilizar a RMN para fins comparativos com dados da literatura e confirmação do método cromatográfico com sensibilidade adequada para a detecção do residual de BPL nas soluções estudadas;
- Utilizar o método proposto para realizar um acompanhamento do comportamento da BPL em meio aquoso, tampão HEPES e tampão TRIS.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Soluções Virais

As soluções virais utilizadas neste trabalho foram produzidas por Bio-Manguinhos. Foram preparadas em tampão HEPES e tampão TRIS (pH = 8,5). As condições de inativação foram desenvolvidas conforme o protocolo interno de Bio-Manguinhos, com a recomendação de manter as amostras a temperatura de 4<sup>o</sup>C. Foram utilizadas amostras controle, sem a presença de BPL e amostras inativadas contendo BPL para cada um dos tampões estudados. A composição das soluções encontra-se descrita nos itens 3.1.1.1 e 3.1.1.2.

##### 3.1.1.1 Composição da solução viral em tampão HEPES

A solução viral em tampão HEPES inativada foi preparada com o vírus 17DD, tampão HEPES 50 mM, NaCl 0,3M e 300 mgL<sup>-1</sup> de BPL. Uma solução controle foi produzida de forma idêntica na ausência de BPL. A constituição e as concentrações de ambas as soluções foram preparadas conforme protocolo interno de Bio-Manguinhos e conservadas a 4<sup>o</sup>C.

##### 3.1.1.2 Composição da solução viral em tampão TRIS

A solução viral em tampão TRIS inativada foi preparada com o vírus 17DD, tampão TRIS 50 mM + NaCl 0,3M + Sorbitol 8% e 300 mgL<sup>-1</sup> de BPL. Uma solução controle foi preparada de forma idêntica na ausência de BPL. Ambas foram preparadas conforme protocolo interno de Bio-Manguinhos e conservadas a 4<sup>o</sup>C.

#### 3.2 REAGENTES

Os reagentes, substâncias químicas e solventes utilizados no preparo das soluções e da fase móvel foram:

- Betapropiolactona – Natalex; teor: 97%; lote: 1000/02/14; validade: 03/02/15;

- Ácido 3- Hidroxiproiônico – Sigma Aldrich; lote B000219793; validade 01/05/16;
- Tampão HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid) – Sigma Aldrich; teor: 99,5%%; lote: 038K5406; validade: 30/06/2014;
- Tampão TRIS (Tri-hidroximetil-aminometano) - Sigma Aldrich; lote: 101K5435; teor: 99,9%; validade: 02/17;
- Acetonitrila - grau HPLC, Merck;
- Ácido fórmico - grau HPLC, Merck;
- Álcool isopropílico - grau HPLC, Merck

### 3.3 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram:

- Cromatógrafo Gasoso Varian CP3800;
- Cromatógrafo Líquido Dionex Ultimate 3.000 RS pump HPLC;
- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear Avance IIIHD 400MHz;
- Balança Analítica Ohaus<sup>®</sup> Modelo Adventurer Pro;
- Sistema de purificação de água Millipore Simplicity UV;
- Potenciômetro Micronal modelo B 474

### 3.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DA BPL

Neste trabalho foram estudadas a utilização de dois tipos de cromatografia para o acompanhamento da BPL nas soluções em estudo, a CGAR e a CLAE.

### 3.4.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CGAR

A cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) é uma técnica consolidada para a análise de misturas que contêm compostos voláteis e semivoláteis (PEDROSO, 2011).

Inicialmente, optou-se por desenvolver metodologia analítica por CGAR com detecção por ionização de chama, devido às características da molécula. O Cromatógrafo Gasoso utilizado foi o *Varian CP380*, a fase estacionária escolhida foi uma coluna do tipo FFAP (*Free Fatty Acid Phase*) e as condições cromatográficas foram selecionadas conforme as especificações do equipamento e da molécula.

#### 3.4.1.1 Preparo das amostras

- BPL em clorofórmio

Como a BPL é uma molécula altamente reativa em meio aquoso, a amostra foi preparada em clorofórmio. Foram preparadas amostras na concentração de 300 mgL<sup>-1</sup>, similar a concentração das soluções virais inativadas. Foi injetado 1 µL de amostra.

- 3-HPA em água

A fim de conhecer o perfil cromatográfico do 3-HPA, principal produto de degradação da BPL. Foi preparada uma amostra com concentração de 1200 mgL<sup>-1</sup>. Foi injetado 1 µL de amostra.

- BPL em água

Foi realizada a análise da BPL diluída em H<sub>2</sub>O, no intuito de observar os produtos formados. As amostras foram preparadas na concentração de 300 mgL<sup>-1</sup>, (mesma a concentração das soluções virais inativadas). Realizou-se o estudo da amostra em meio aquoso a 4<sup>0</sup>C, temperatura de inativação viral e a temperatura ambiente para fins comparativos com estudos anteriores realizados por METZ e colaboradores em 2011. Foi injetado 1 µL de cada amostra imediatamente após o preparo, em separado.

Destaca-se que neste trabalho, as amostras foram preparadas no momento da injeção e as temperaturas foram medidas imediatamente antes da introdução das mesmas no equipamento. A amostra a 4<sup>o</sup>C foi preparada e mantida em banho de gelo, enquanto a amostra a temperatura ambiente foi exposta as condições laboratoriais.

- BPL em tampão HEPES

Para o estudo da BPL em tampão HEPES, analisou-se três soluções: a solução viral inativada (01), a solução controle (01) e uma amostra preparada, no momento da injeção, composta de 1000 µL da solução controle adicionada de 3 µL de BPL, a fim de observar a formação dos produtos de degradação (01). Foi injetado 1 µL de cada uma das 03 amostras, em separado.

- BPL em tampão TRIS

Para o estudo das soluções em tampão TRIS, realizou-se o mesmo procedimento, foi analisada a solução viral inativada (01), a solução controle (02) e a amostra recém preparada constituída de 1000 µL da solução controle adicionada de 3 µL de BPL (03). Foi injetado 1 µL de cada uma das 03 amostras, em separado.

Os resultados obtidos através da CGAR-FID mostraram-se inconclusivos, havendo a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia por CLAE.

### 3.4.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais difundida para análise qualitativa e quantitativa. Dentre as razões para este crescimento está à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHI *et al*, 2002).

Trabalhou-se inicialmente com CLAE- UV, em fase normal, para garantir a estabilidade da BPL. Diante de resultados não satisfatórios realizou-se a tentativa com detector de aerosol carregado por CAD Corona, técnica que não apresentou

sensibilidade para detecção da BPL. Alternativamente optou-se pela utilização de CLAE acoplada ao espectrômetro de massas (MS) que também não conduziu a bons resultados na eluição da molécula. Diante fracasso das tentativas foi proposto um método utilizando CLAE-UV, em fase reversa.

No desenvolvimento da metodologia por CLAE- UV foram selecionados o solvente, a fase móvel e o comprimento de onda adequados para determinação dos analitos (195 nm) de acordo com as características da molécula. Inicialmente a análise cromatográfica foi realizada em modo gradiente. Após o conhecimento do perfil cromatográfico foram otimizadas as condições de análise para realização em modo isocrático.

O preparo das amostras foi conforme descrito para as amostras analisadas por CGAR-FID (item 3.4.1.1) em meio aquoso, em tampão HEPES e em tampão TRIS.

### 3.4.3 Análise por espectroscopia de RMN

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica utilizada como instrumento de elucidação estrutural de moléculas orgânicas de baixo peso molecular ou macromoléculas como proteínas. Atualmente é também utilizada para fins quantitativos. É uma técnica não invasiva e não destrutiva, de modo que a amostra está disponível para a análise subsequente por uma técnica alternativa (HOLZGRABE, 2010). A RMN de hidrogênio e carbono -13 indica a disposição do esqueleto hidrocarbônico, ou seja, as diferentes situações de ambientes químicos dos átomos de hidrogênio e carbono na estrutura (RIBEIRO & SOUZA, 2007) e fornece uma variedade de informações estruturais como mudanças químicas e nucleares múltiplas ou integrais em segunda ou terceira dimensão, 2D ou 3D (MARTINOVA, HOLZGRABE, 2011). A área de um sinal de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos correspondentes e, portanto, é diferente de outras técnicas em que a resposta não é dependente da estrutura molecular (CLARIDGE, 2009).

Neste trabalho, baseado nos resultados de METZ e colaboradores em 2011 utilizou-se a espectroscopia de RMN de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ ), para fins comparativos. Os espectros de RMN-  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos no equipamento Avance III HD 400MHz, operando em 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  utilizando água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Inicialmente avaliou-se os deslocamentos característicos das estruturas química da BPL, do 3-HPA, do tampão HEPES e do tampão TRIS. O preparo das amostras foi conforme descrito na tabela 1.

Tabela1: Preparo das amostras para espectroscopia de RMN

<b>Amostras</b>	<b>Volume/ massa</b>	<b>Diluyente</b>
BPL	5 $\mu\text{L}$	$\text{CDCl}_3$
3- HPA	80 $\mu\text{L}$	$\text{D}_2\text{O}$
Tampão HEPES	25 mg	$\text{D}_2\text{O}$
Tampão TRIS	25 mg	$\text{D}_2\text{O}$

#### 3.4.3.1 Reação da BPL em $\text{H}_2\text{O}$

No intuito de conhecer a estrutura hidrocarbônica dos produtos gerados através da reação da BPL com  $\text{H}_2\text{O}$  foram diluídos 5  $\mu\text{L}$  de BPL em  $\text{D}_2\text{O}$ . Esta amostra foi analisada imediatamente após o preparo. Esse espectro foi comparado aos espectros da BPL em  $\text{CDCl}_3$  e do 3-HPA.

#### 3.4.3.2 Reação da BPL em tampão HEPES

Para avaliar o comportamento de BPL em tampão HEPES foram comparados os espectros do tampão HEPES, da reação tampão HEPES +  $\text{H}_2\text{O}$  + BPL e do 3-HPA. A amostra da reação foi preparada pela adição de 20 mg do tampão HEPES, 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  e 67  $\mu\text{L}$  BPL. A reação foi submetida a temperatura de  $-80^\circ\text{C}$  por 2h e posterior liofilização.

### 3.4.3.3 Reação da BPL em tampão TRIS

O estudo das reações da BPL em tampão TRIS foi realizado comparando os espectros do tampão TRIS, da reação tampão TRIS + H<sub>2</sub>O + BPL com os espectros obtidos para o 3-HPA. A amostra da reação foi obtida pesando 20 mg do tampão TRIS e adicionando-se 1 mL de H<sub>2</sub>O e 67 µL BPL. A reação foi submetida à temperatura de -80°C por 2h e posterior liofilização.

### 3.5 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DA BPL EM DIFERENTES MEIOS

Foi utilizada a metodologia analítica proposta por CLAE - UV para avaliar o residual de BPL nos meios estudados. Foram realizadas 10 injeções sucessivas de soluções recém - preparadas de BPL (concentração 1000 µg/mL) nos meios H<sub>2</sub>O a 4°C e 20°C, em tampão HEPES e em tampão TRIS a 4°C. Foram traçados gráficos área *versus* tempo, utilizando o programa EXCEL, versão Windows XP.

Para interpretar os dados experimentais e o mecanismo que controlava o processo das reações os modelos cinéticos de ordem zero, pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem foram testados e uma boa correlação dos dados cinéticos revelou o mecanismo (tabela 2).

Tabela 2: Resumo das equações dos modelos cinéticos testados no experimento

Ordem da reação	Equação de Velocidade	Gráfico da reta angular	Coefficiente angular
0	$-[R]\Delta T = K [R]^0$	$[R]_t$ versus t	
1	$-[R]\Delta T = K [R]^1$	$\ln [R]_t$ versus t	
2	$-[R]\Delta T = K [R]^2$	$1/[R]_t$ versus t	

Onde:

R= área BPL

k = coeficiente angular

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE BPL

#### 4.1.1 Desenvolvimento de metodologia analítica por CGAR

A cromatografia gasosa foi à primeira técnica de escolha para a determinação da BPL, pois a BPL é uma molécula facilmente volatilizável em temperatura não muito elevada que apresenta baixa massa molar (72,06 g/mol).

A fase estacionária escolhida foi uma coluna do tipo FFAP (*Free Fatty Acid Phase*) que teoricamente permitiria a eluição do éster (lactona) e do seu principal produto de degradação, o 3-HPA. Foi escolhido o detector FID em função da resposta quase universal, da faixa de linearidade ampla, da simples manipulação e da resposta rápida do mesmo (VISENTAINER, 2012). Para seleção das temperaturas do forno, do injetor e do detector partiu-se de temperaturas amenas até o alcance da eluição do sinal analítico bem definido. A tabela 3 apresenta as condições cromatográficas selecionadas.

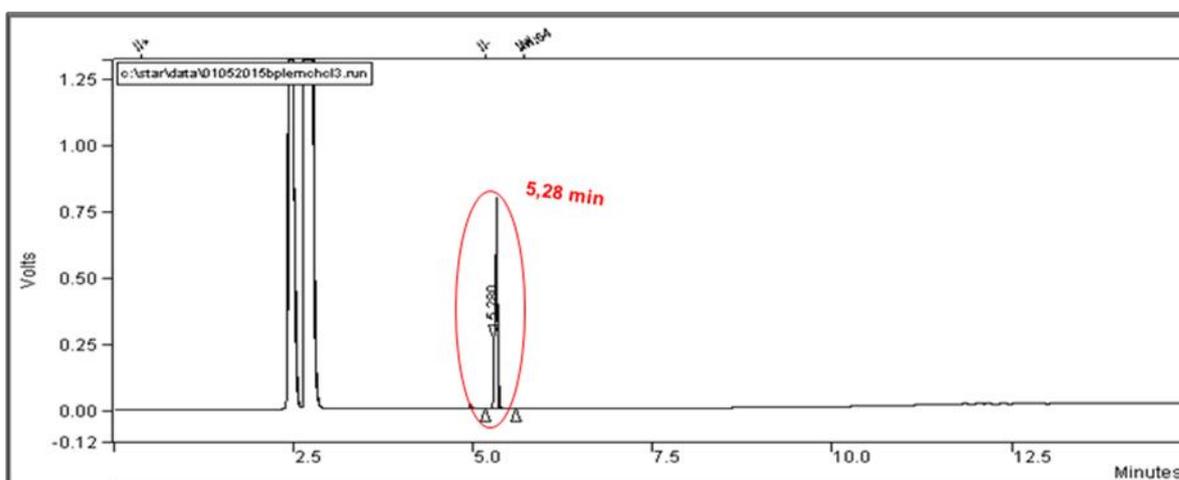
Tabela 3: Condições cromatográficas utilizadas na CGAR

<b>Detector</b>	Ionização em chama (FID)
<b>Temperatura do forno</b>	80 - 200°C
<b>Temperatura do injetor</b>	220°C
<b>Temperatura detector</b>	250°C
<b>Tempo de análise</b>	15 minutos

O solvente de escolha foi o clorofórmio, baseado na estabilidade da molécula neste solvente, comprovada em FISHBEIN *et. al* (1970). No cromatograma da BPL em clorofórmio foram observados três sinais. Dois com tempo de retenção (TR) em aproximadamente 2,50 minutos, com baixa resolução entre eles e com grande

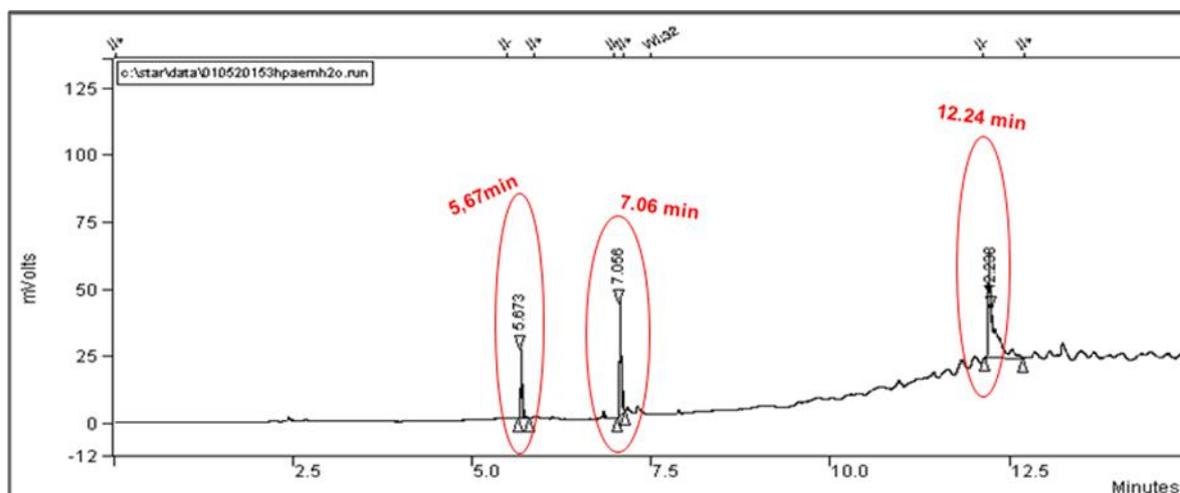
intensidade que foram atribuídos ao solvente. O terceiro sinal, com TR de aproximadamente 5,28 minutos bem resolvido em relação aos outros dois foi atribuído à BPL (figura 4).

Figura 4: Cromatograma da BPL solubilizada em clorofórmio, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3



Quanto à análise cromatográfica do 3-HPA diluído em água, nas condições experimentais estabelecidas na tabela 3, observou-se o aparecimento de 3 sinais analíticos bem resolvidos, com TR 5,67, 7,06 e 12,24 minutos, respectivamente. Considerando o teor de pureza rotulado de 30% p/p de 3-HPA, os sinais podem ser referentes a subprodutos da rota de síntese do ácido ou a produtos da desidratação da molécula no *insert* (figura 5).

Figura 5: Cromatograma do 3- HPA em água, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3



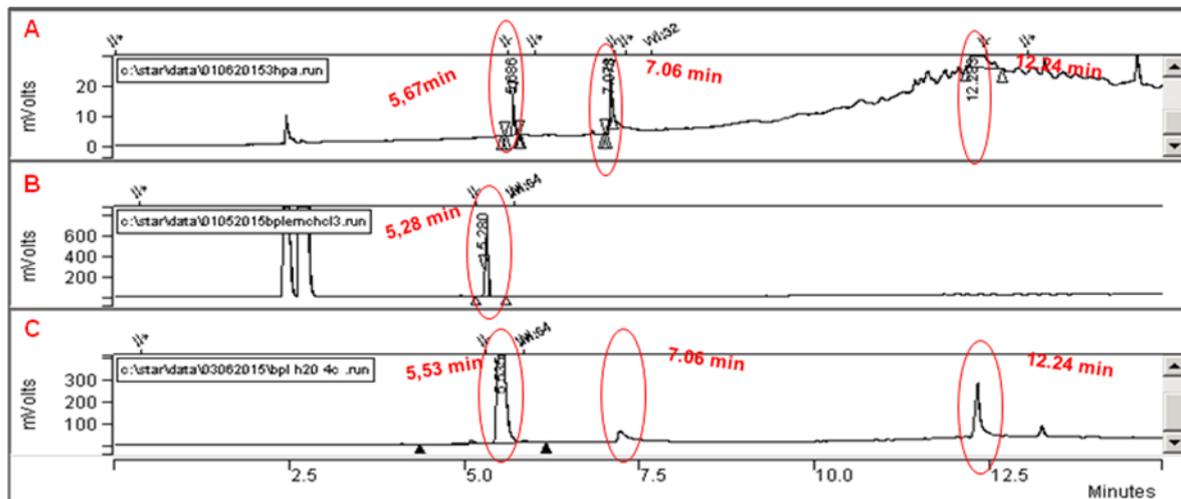
A temperatura medida para a amostra a temperatura ambiente imediatamente antes da injeção foi de 20°C. Os tempos de retenção dos sinais encontrados para a análise da BPL em água a 4 °C e 20°C foram os mesmos. Desta forma utilizou-se o cromatograma da amostra a temperatura mais baixa para fins comparativos.

O cromatograma da BPL diluída em água a 4°C (figura 6C), injetada imediatamente após o preparo, mostrou a formação de produtos de degradação da molécula. Foi observada a formação de 03 três sinais com TR 5,67; 7,06 e 12,24 minutos, respectivamente. Era esperada a formação de sinais similares aos encontrados no cromatograma do 3-HPA (figura 6A), em função da hidrólise da molécula e, esta coincidência de sinais analíticos pode ser observada na figura 5, corroborando com essa teoria.

Observou-se também que nenhum dos TR observados no cromatograma da BPL em água a 4°C apresentou o mesmo TR da molécula em clorofórmio (5,28 minutos), conforme figura 6B. Este fato pode ser explicado pela mudança do meio de dissolução (de clorofórmio para água) ou pela da hidrólise imediata da molécula em meio aquoso. Considerando que os estudos desenvolvidos por METZ e colaboradores em 2011, utilizando a espectroscopia de RMN, demonstraram que o tempo de meia vida da BPL em água, à temperatura ambiente, está entre 3 e 4

horas (não foram encontrados dados na literatura sobre a estabilidade da molécula a 4°C), o não aparecimento de sinal analítico em 5,28 minutos na CG/FID gerou suspeitas quanto a sensibilidade do método para o fim pretendido.

Figura 6: Cromatogramas do 3- HPA (A), da BPL diluída em clorofórmio (B) e da BPL diluída em água a 4°C (C), utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3



Como a concentração do tampão e a natureza do nucleófilo influenciadas por parâmetros globais como pH, temperatura, impedimento estérico e tipo de interação tendem a diminuir a estabilidade de BPL, foram analisadas as soluções controle HEPES e controle TRIS adicionadas de BPL, afim de observar a formação dos produtos da reação da molécula com os nucleófilos presentes nos meios.

Comparando os cromatogramas das soluções controle e inativada em tampão HEPES (figuras 7 e 8), observou-se que a solução controle não apresentou sinais. Fato esperado uma vez que na composição do tampão não há presença de substâncias volatilizáveis. A solução inativada não apresentou sinal com TR próximo a 5,28 minutos (TR da BPL em clorofórmio) e apresentou dois sinais com TR de aproximadamente 7,0 e 12,0 minutos, tempos coincidentes com os dos sinais visualizados no cromatograma do 3- HPA. Quanto ao sinal que foi observado em 7,0 minutos, sabendo que solução tampão HEPES contém NaCl 0,3 mol/L em sua composição, acredita-se que o mesmo possa ser referente ao ácido 3-

cloropropiônico, produto que METZ e colaboradores, 2011 atribuíram a reação da BPL com íon  $\text{Cl}^-$ .

Figura 7: Cromatograma da Solução controle tampão HEPES, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3

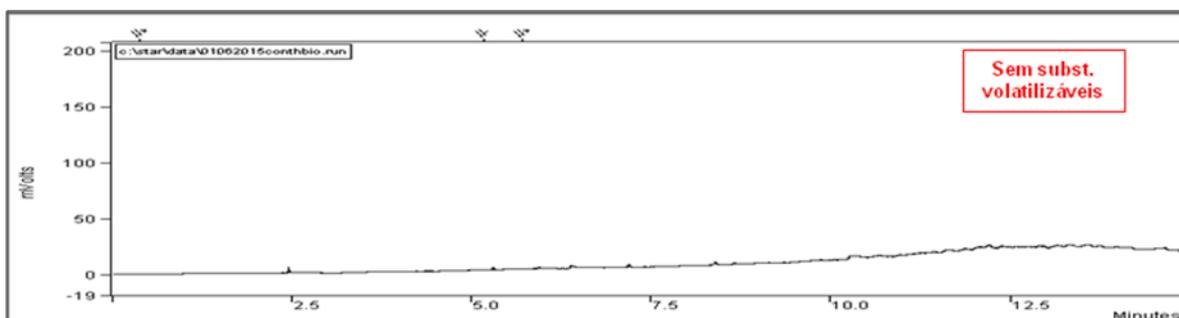
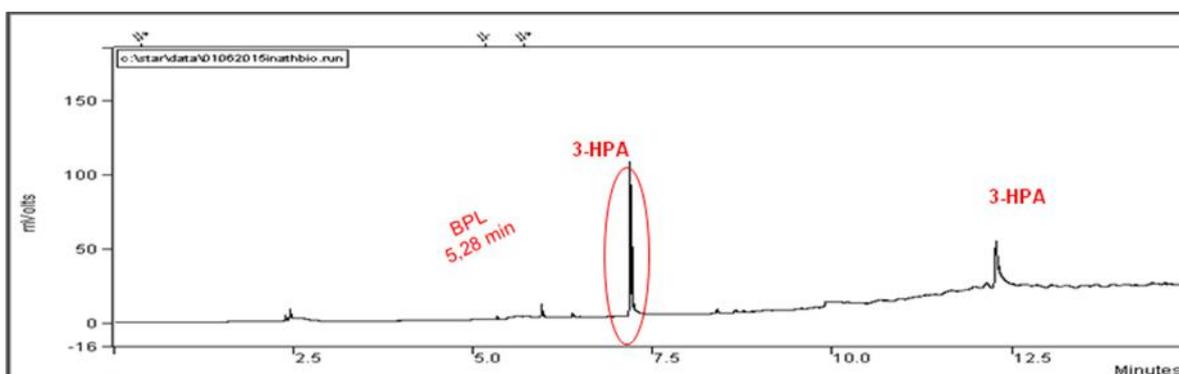


Figura 8: Cromatograma da Solução inativada em tampão HEPES, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3



A análise comparativa dos cromatogramas das soluções controle e inativada em tampão TRIS (figuras 9 e 10), mostrou que a solução inativada apresentou sinais de pequena intensidade em aproximadamente 2,5; 6,0 e 7,0 minutos que não foram observados na solução controle. A composição da solução tampão TRIS também apresenta  $\text{NaCl}$  0,3 mol/L o que reforça a teoria de que o sinal próximo a 7,0 minutos seja referente ao ácido 3- cloropropiônico.

Figura 9: Cromatograma da Solução controle tampão TRIS, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3

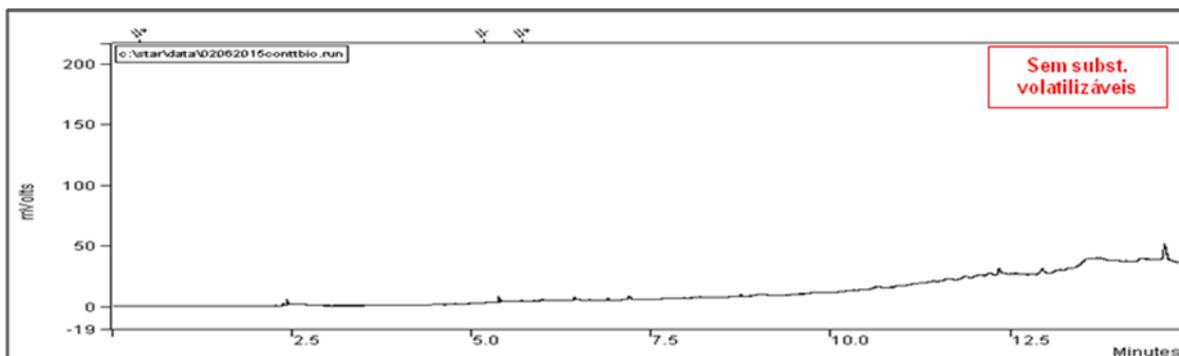
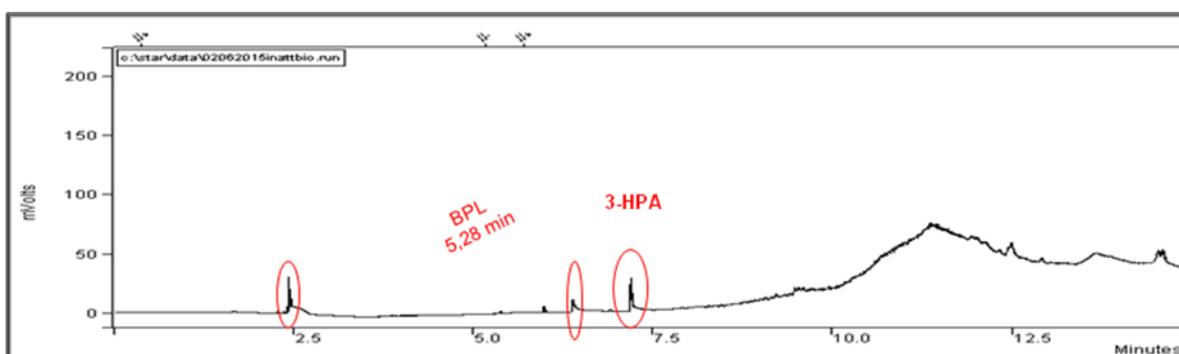


Figura 10: Cromatograma da Solução inativada em tampão TRIS, utilizando condições cromatográficas descritas na tabela 3



A CGAR apresenta como característica as altas temperaturas a qual a amostra precisa ser submetida para vaporização. Neste trabalho, as soluções foram submetidas a 220<sup>o</sup>C, com tempo de residência suficiente para que sítios ativos do insertor (*liner* ou tubo de vidro) adsorvessem ou induzissem à degradação térmica da BPL antes da mesma ser transferida para a coluna. Como MASSE (1972) trabalhou com análise de BPL por cromatografia gasosa, em temperatura mais amena (150 <sup>o</sup>C) e realizando prévia destilação da solução viral, foi levantada a hipótese que a temperatura utilizada no método desenvolvido poderia ter facilitado a hidrólise da BPL em seus derivados isômeros de lactato e no ácido 3-HPA.

Segundo PINHO *et. al*, 2009, entre as alternativas para evitar a degradação térmica da amostra no injetor estão à introdução da amostra com temperatura programada de vaporização (TPV), técnica na qual a um grande volume de amostra é introduzido no injetor em temperatura apropriada para a vaporização apenas do

solvente, para formar depósitos do analito no compartimento de injeção. Depois, o compartimento é aquecido em temperatura apropriada de forma vaporizar e transferir os compostos para a coluna cromatográfica. Outra maneira de minimizar o *stress* térmico da amostra seria utilização de um controle de pressão eletrônico no injetor, que vaporiza a amostra com alta vazão de gás de arraste para coluna. Desta forma, a amostra é carregada rapidamente, apresentando menor tempo de residência no *insert*. A terceira opção para evitar a degradação térmica da amostra e, a disponível no laboratório, foi a injeção direta na coluna (*on column*). Porém os resultados obtidos não diferiram dos encontrados para a amostra vaporizada no injetor. Sendo assim, diante da incerteza quanto ao tempo de estabilidade da BPL em meio aquoso observada na CGAR-FID optou-se pelo desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE.

#### 4.1.2 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE

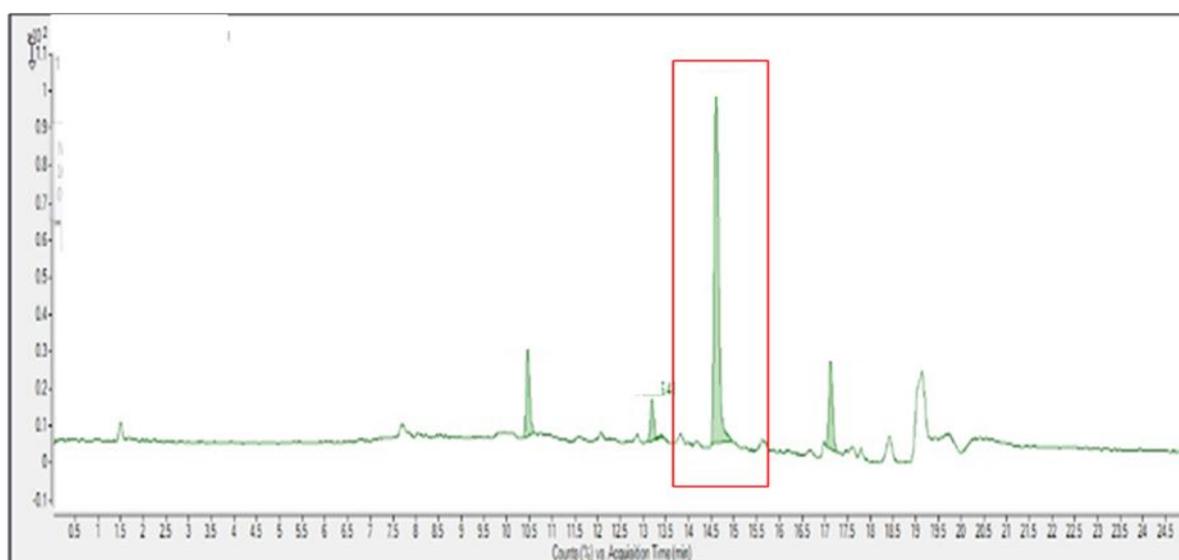
Diante dos resultados obtidos por cromatografia gasosa, iniciou-se a tentativa de trabalhar com CLAE, em fase normal, visando a garantir a estabilidade da BPL. Trabalhou-se com fase estacionária de sílica que apresenta a alta polaridade e uma fase móvel de baixa polaridade. Foram realizados testes de solubilidade da BPL em diversos solventes e diante da boa solubilidade da BPL em hexano e álcool isopropílico, selecionou-se a proporção 50:50 de cada um dos solventes como condição inicial. Desta maneira, o grupo funcional da sílica, a hidroxila, interagiria com o grupo polar da BPL e do 3-HPA (grupo -OH), proporcionando adsorção entre os grupos. Trabalhou-se em modo isocrático. O detector escolhido foi o de absorção no ultravioleta, em comprimento de onda de 195 nm, visto que tanto a BPL quanto o 3-HPA possuem cromóforos com elétrons desemparelhados e nesta região espectral também seria possível detectar as reações de alquilação ou acilação da BPL com os nucleófilos dos tampões.

As amostras de BPL diluída em clorofórmio e do 3-HPA apresentaram sobreposição de sinais. Foi aumentada a porcentagem de hexano até 90% contudo,

o máximo de resolução calculada foi de 1,4, abaixo do valor definido pela Farmacopeia Americana (o mínimo de 1,8) como aceitável em metodologias cromatográficas (CHUST, 1990). Não foi possível trabalhar com acréscimo de hexano na fase móvel até 100%, que a princípio melhoraria a resolução entre os sinais, pois tanto a BPL como o 3-HPA não apresentaram solubilidade neste solvente. Foi realizada a tentativa de eluição por gradiente, mas esta foi descartada devido à longa demanda de tempo para reequilibrar a coluna, com a mudança de composição dos eluentes.

O utilização do Detector CAD Corona apesar de ser recomendada para detecção de analitos não voláteis ou semi-voláteis, com ou sem cromóforo, não foi sensível para detecção da BPL e do 3-HPA. Alternativamente optou-se pela utilização de CLAE-MS, técnica que também não conduziu bons resultados na eluição da molécula, pois a necessidade de diluição da amostra até níveis de 1000 ppb, gerou diversos ruídos, atribuídos à qualidade da água (figura 11).

Figura 11: Cromatograma da BPL diluída em água analisada por CLAE-MS.



A ausência de seletividade e/ou sensibilidade das técnicas testadas, conduziu os experimentos para a utilização da CLAE-UV em fase reversa, apesar da alta

polaridade da BPL e do 3-HPA, bem como dos componentes dos tampões HEPES e TRIS. Os experimentos passaram a ser conduzidos na presença de água.

A fase móvel escolhida foi solução de ácido fórmico 0,1% v/v e acetonitrila. O detector e o comprimento de onda foram mantidos os mesmos dos utilizados nos experimentos conduzidos em fase normal (UV e 195 nm). Foi necessário um ajuste de pH da solução de ácido fórmico para 2,5, priorizando, a supressão da ionização do 3-HPA que tem pKa 4,5. As condições cromatográficas foram as descritas na tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas para CLAE-UV, em modo isocrático e em modo gradiente

<b>Coluna</b>	Shimadzu SBC-ODS (2,5 x 15 cm); 5 $\mu$ ;
<b>Fase móvel A</b>	Solução ácido fórmico 0,1% v/v, pH 2,5
<b>Fase móvel B</b>	Acetonitrila
<b>Volume de injeção</b>	5 $\mu$ L
<b>Temperatura forno e bandeja</b>	20 <sup>0</sup> C
<b>Comprimento de onda</b>	195 nm;
<b>Fluxo</b>	0,2 mL /min

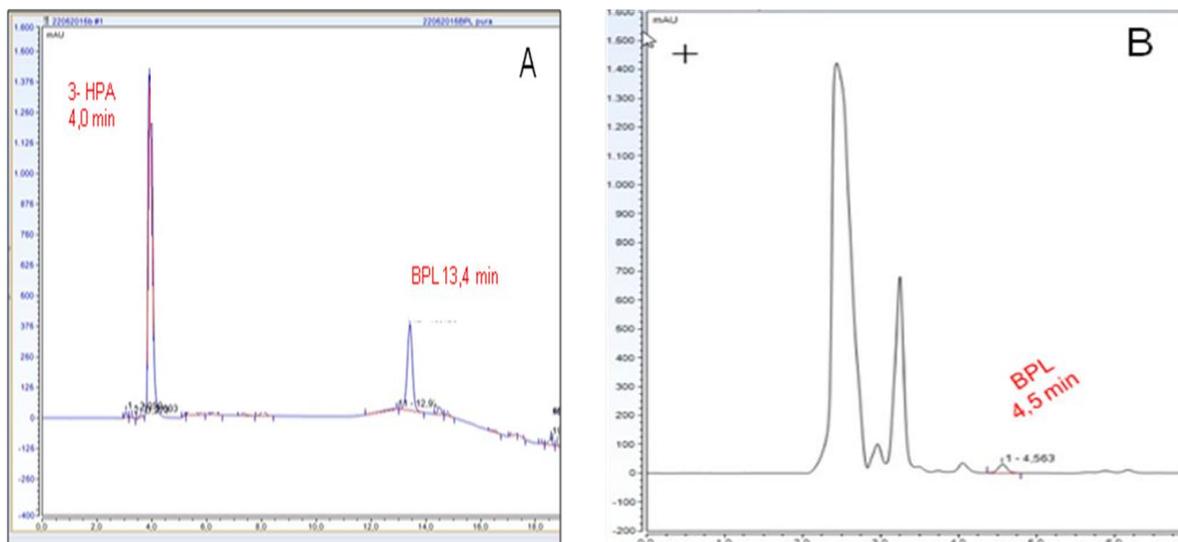
A reatividade da BPL em meio aquoso induziu a um estudo utilizando os modos isocrático (60% fase móvel A e 40% fase móvel B) e gradiente, conforme tabela 5), a fim de avaliar o comportamento da molécula nas condições estabelecidas. Quando se utilizou a eluição por gradiente, a mudança na composição da fase móvel (diferença de polaridade) e a variação da porcentagem alteraram a força da fase móvel e fizeram com que os sinais retidos eluissem mais lentamente.

Tabela 5: Gradiente utilizado na CLAE-UV

Tempo(min)	Fase móvel A(%)	Fase móvel B(%)
0	90	10
15	50	50
15,5	90	10
30	90	10

O cromatograma utilizando o modo gradiente apresentou o sinal da BPL em 13,4 minutos e do 3-HPA em 4,0 minutos (figura 12 A), com tempo de corrida de 30 minutos. No modo isocrático, utilizando as mesmas condições cromatográficas, a BPL eluiu em 4,5 minutos (figura 12 B), porém a corrida cromatográfica foi estendida até 15 minutos em função dos inúmeros produtos formados pela degradação da BPL nestas condições.

Figura 12: Cromatogramas da BPL utilizando CLAE em modo gradiente (A) e modo isocrático (B), utilizando as condições cromatográficas descritas na tabela 4.



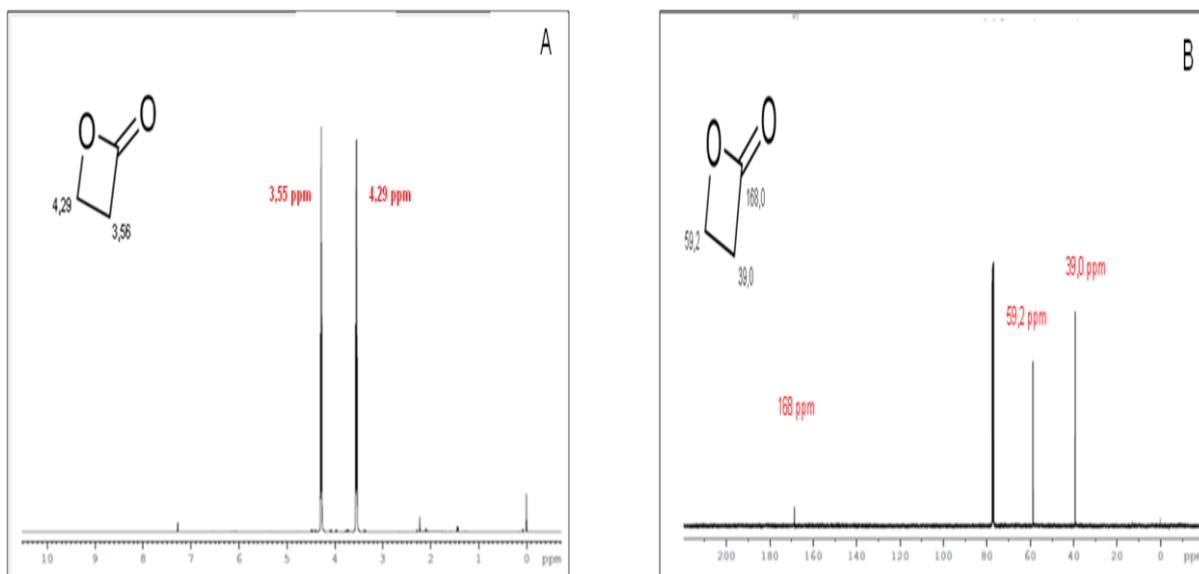
Foram comparados os resultados das áreas relativas à primeira injeção da BPL nos meios aquoso a 20°C e nos tampões HEPES e TRIS a 4°C. As áreas encontradas foram respectivamente: 9,1476; 3,9298 e 0,954. Levando-se em conta

que foram adicionadas as mesmas quantidades de BPL a cada meio, a diferença nas áreas levou a concluir que, muito possivelmente, ocorreram reações imediatas da BPL com uma ou mais substâncias da solução viral, além dos ataques dos nucleófilos da carga viral.

#### 4.1.3 Análise por espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN -  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a BPL diluída em  $\text{CDCl}_3$  apresentaram deslocamentos característicos da estrutura da BPL. Teoricamente os sinais da ligação  $\text{R-COO-CH}$ , no espectro de RMN -  $^1\text{H}$ , deveriam estar na região entre 3,5 – 4,8 e foram encontrados sinais em 3,55 e 4,29 ppm (figura 13 A). Para o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , a literatura aponta para a ligação  $\text{C=O}$  o aparecimento de sinais na região entre 155 e 180 ppm. Como resultado foi observado um sinal em 168,0 ppm e mais outros dois sinais, em 39,0 ppm e 59,2 ppm, característicos da função alcano (figura 13 B). Esses resultados sugerem a preservação da molécula sob as condições de armazenamento às quais estava submetida.

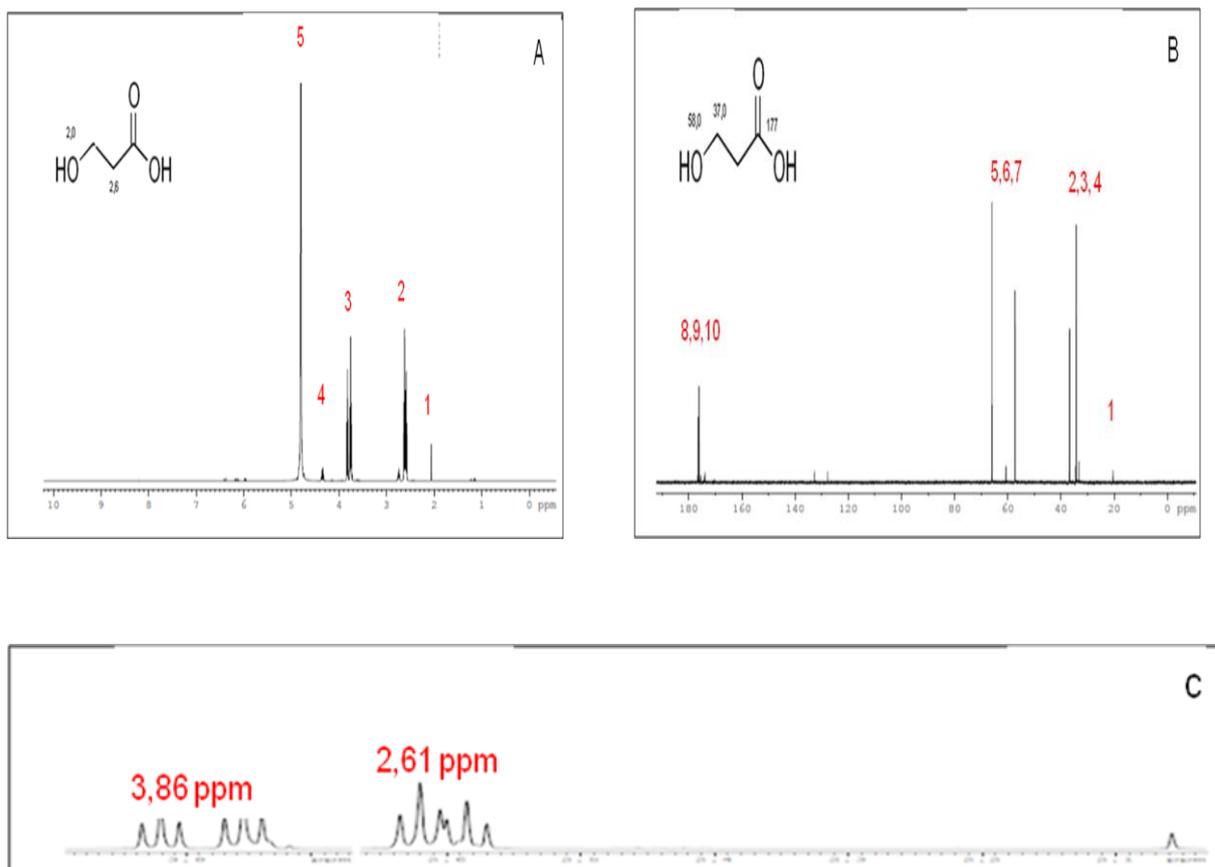
Figura 13: Sinais característicos da estrutura química da betapropiolactona diluída em  $\text{CDCl}_3$ , espectros de RMN- $^1\text{H}$  (A), RMN- $^{13}\text{C}$  (B)



A suspeita quanto à presença de substâncias estranhas (subprodutos da rota de síntese ou desidratação no *insert*) constatadas para a molécula do 3-HPA, levantada com a utilização da CGAR-FID, foi confirmada com os espectros de RMN- $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da molécula. Tanto o espectro de RMN- $^1\text{H}$  quanto o de RMN- $^{13}\text{C}$  apresentaram sinais extras. Era esperado como resultado para o espectro de RMN- $^1\text{H}$  somente três sinais (dois sinais entre 0,7 e 2,0 ppm para alcanos e um sinal para OH na região entre 2,1 e 2,5 ppm), no entanto foram observados 5 sinais principais (figura 14 A). Expandindo o espectro pode-se observar a formação de um duplo

tripleto em 2,61 e 3,86 ppm (figura 14 C). Quanto ao espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , deveriam ser observados apenas três sinais, porém foram encontrados dez sinais, conforme ilustrado na figura 14 B.

Figura 14. Sinais característicos da estrutura química do 3-HPA, espectro de RMN- $^1\text{H}$  (A), de RMN- $^{13}\text{C}$  (B) e expansão do espectro de RMN- $^1\text{H}$  (0,0 - 4,0 ppm) do 3-HPA (C)



Foi avaliado o comportamento da BPL em tampão HEPES. Foram comparados os espectros de RMN- $^1\text{H}$  da solução tampão HEPES (figura 15), da reação tampão HEPES +  $\text{H}_2\text{O}$  + BPL (figura 16) e do 3-HPA, principal produto de degradação da BPL. Pode-se observar a formação do 3-HPA no espectro da reação através da formação de duplo tripleto em aproximadamente 3,86 e 2,61 ppm, característicos do espectro do ácido (figura 17).

Observou-se também que alguns deslocamentos característicos do tampão HEPES (figura 15) ainda puderam ser visualizados no espectro de RMN-<sup>1</sup>H da reação HEPES + H<sub>2</sub>O + BPL (figura 16), sem alteração.

Figura 15: Sinais característicos da estrutura química do tampão HEPES, espectro de RMN-<sup>1</sup>H

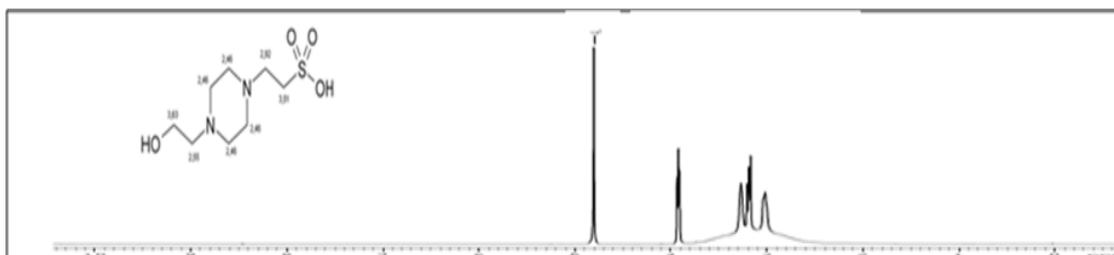


Figura 16: Espectro de RMN - <sup>1</sup>H da reação tampão HEPES + H<sub>2</sub>O +BPL

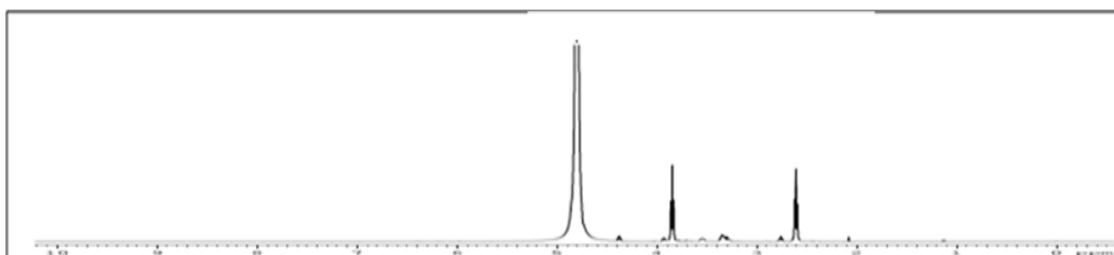
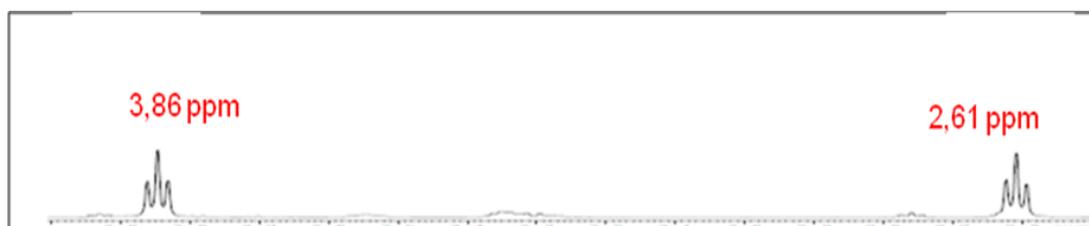


Figura 17: Expansão do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (2,4 -4,0 ppm) da reação HEPES + H<sub>2</sub>O +BPL



Foram analisados os espectros de RMN-<sup>13</sup>C do tampão HEPES (figura 18) e da reação tampão HEPES + H<sub>2</sub>O + BPL (figura 19) verificou-se a formação de sinais no espectro da reação. Os sinais observados foram atribuídos a formação do 3-HPA (figura 20), pela presença de sinais em 57,21 e 36,77 ppm, observados no espectro do ácido. Estes sinais não foram observados no espectro do tampão HEPES.

Comparou-se os espectros das figuras 18 e 19, foi possível visualizar que alguns sinais de RMN- <sup>13</sup>C do tampão HEPES encontravam-se nos deslocamentos

originais, indicando, em princípio, que a BPL não reagiu totalmente com tampão HEPES. Entretanto, foram observados falta ou deslocamento de alguns sinais, por exemplo em 48,97 e 51,91ppm do espectro da reação tampão HEPES + H<sub>2</sub>O + BPL (figura 19), sugerindo que houve alteração estrutural, como por exemplo, alguma reação parcial.

Figura 18: Sinais característicos da estrutura química do tampão HEPES, espectro de RMN-<sup>13</sup>C

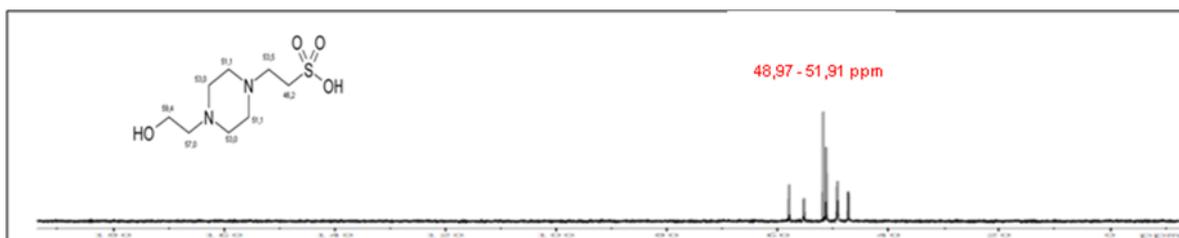


Figura 19: Sinais característicos da estrutura química da reação tampão HEPES + H<sub>2</sub>O + BPL, espectro de RMN-<sup>13</sup>C

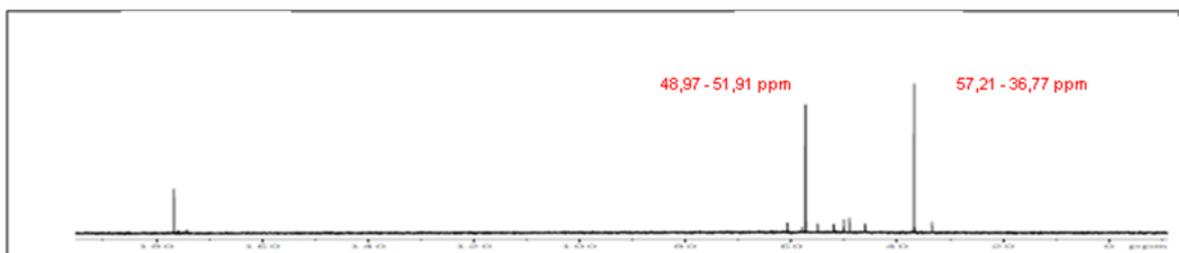
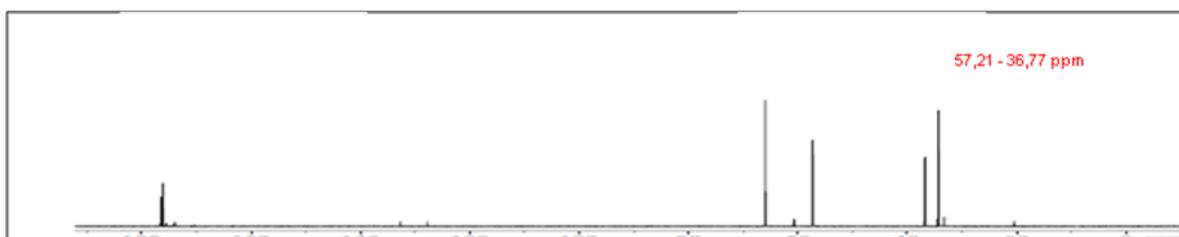


Figura 20: Sinais característicos da estrutura química do 3-HPA, espectro de RMN-<sup>13</sup>C



Estruturalmente o tampão TRIS é uma nucleobase e não apresenta comportamento zwitteriônico, tal como o tampão HEPES. Na comparação dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H do tampão TRIS + H<sub>2</sub>O + BPL e do 3-HPA (figuras 21 e 22), foi possível observar, na reação, a formação do ácido pelo aparecimento de sinais em 3,81 e 2,60 ppm. Além disso, como era esperado, observou-se o

desaparecimento dos sinais característicos do tampão TRIS na região entre 3,0 e 4,0 ppm, fato atribuído ao ataque da amina à BPL.

Figura 21: Sinais característicos da estrutura química do tampão TRIS, espectro de RMN-<sup>1</sup>H

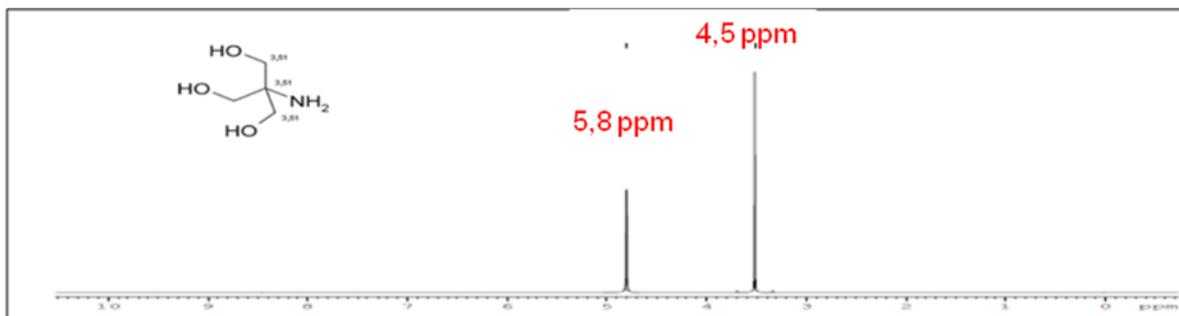
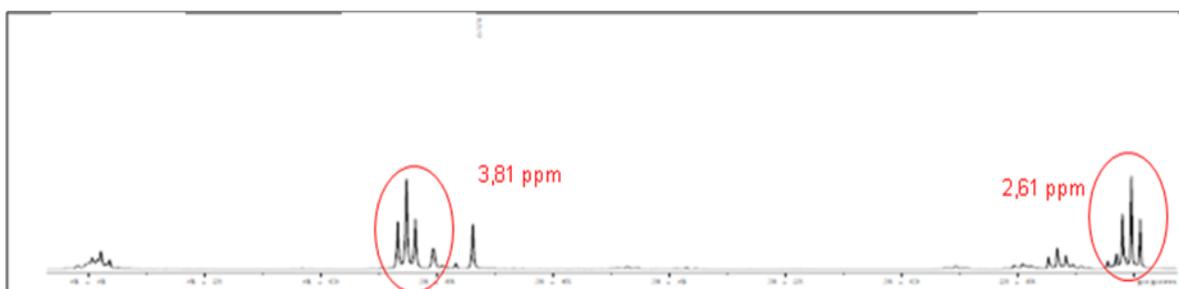


Figura 22: Expansão do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (2,5 - 4,5) do tampão TRIS + H<sub>2</sub>O + BPL



Os espectros de RMN - <sup>13</sup>C do tampão TRIS (figura 23) e do tampão TRIS + H<sub>2</sub>O + BPL (figura 24) mostraram o desaparecimento dos sinais de RMN-<sup>13</sup>C entre 47,15 e 51,85 ppm, característicos do tampão TRIS, além disso visualizou-se na figura 24 o aparecimento de sinais de carbono alquílicos, na região entre 30 e 40 ppm.

Figura 23: Sinais característicos da estrutura química do tampão TRIS, espectro de RMN-<sup>13</sup>C

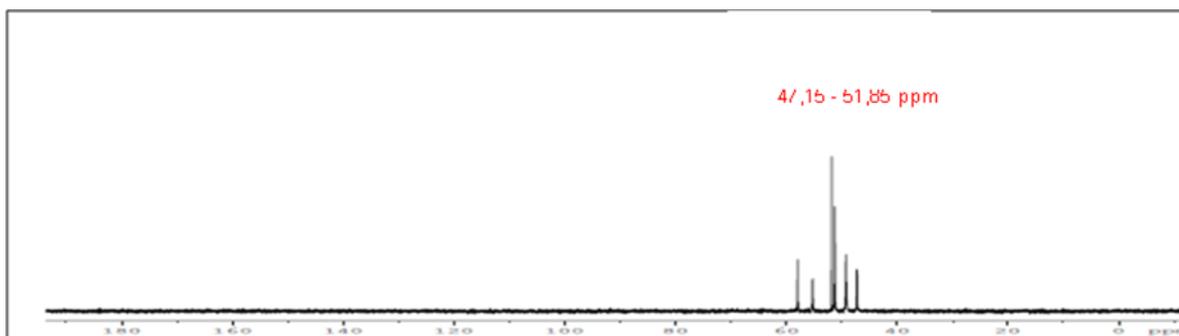
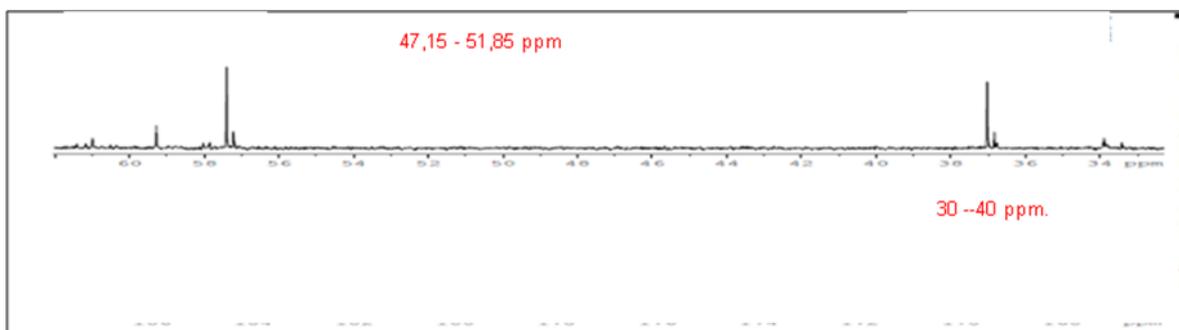


Figura 24: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C do tampão TRIS + H<sub>2</sub>O + BPL



Os resultados obtidos por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C indicaram que ocorreram reações paralelas entre a BPL e os nucleófilos dos meios estudados. Acredita-se que parte da BPL foi transformada no ácido 3-HPA e parte sofreu ataque, podendo formar derivados alquílicos e acílicos. Dessa forma, entendeu-se que o imediato desaparecimento da BPL observado nos resultados fornecidos pela CGAR-FID foi decorrente da desidratação do analito no *insert*. Contudo, adotou-se a CLAE-UV como o método proposto para o estudo do comportamento da BPL em meio aquoso, em tampão HEPES e em tampão TRIS.

#### 4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DE BPL EM DIFERENTES MEIOS.

O método proposto por CLAE-UV demonstrou ser sensível para determinação da existência de resíduo de BPL nas soluções virais. Quando aplicado nos meios

estudados, a análise revelou a presença de BPL até 150 minutos em todos os meios, exceto em tampão HEPES (tabela 6).

Tabela 6: Tempos de detecção do residual de BPL nos diferentes meios estudados

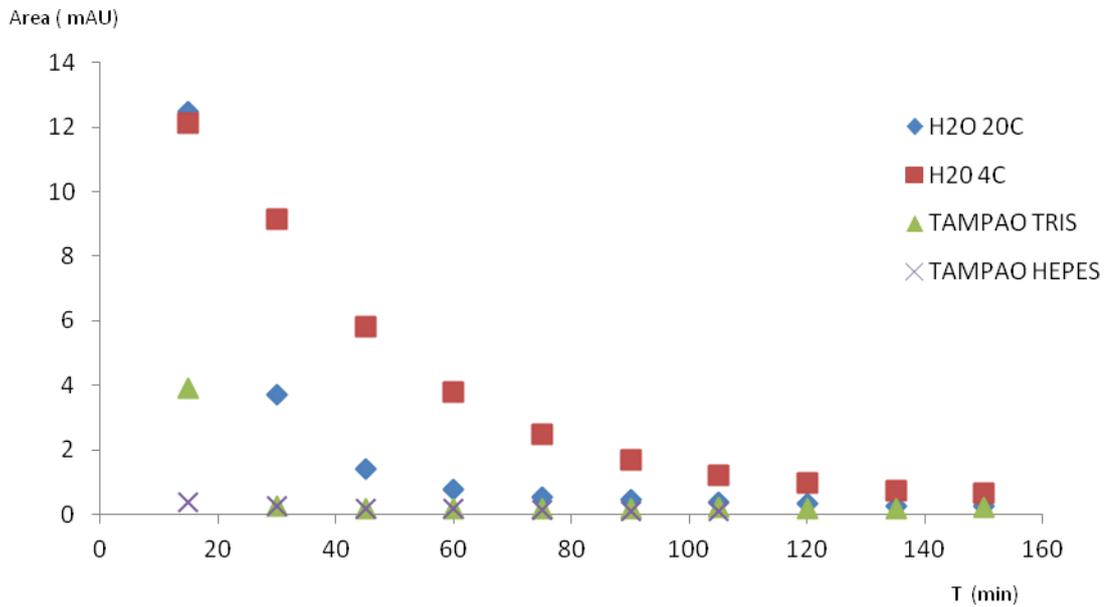
<b>Meio</b>	<b>Tempo (min)</b>
H <sub>2</sub> O 20 <sup>o</sup> C	150
H <sub>2</sub> O 4 <sup>o</sup> C	150
Tampão HEPES	105
Tampão TRIS	150

Em vista da velocidade das reações o método desenvolvido apresentou a limitação de determinar a BPL somente a partir dos 15 minutos de reação (tempo da corrida cromatográfica) mantendo desconhecido o perfil das reações antes deste tempo. No entanto, o método desenvolvido pode ser aplicado alternativamente como método semi- quantitativo, desde que as agências reguladoras nacionais e internacionais especifiquem um limite aceitável de BPL nas soluções virais

A figura 25 ilustra o comportamento da BPL nos diferentes meios em função do tempo de reação. Comparando as reações ocorridas em meio aquoso em ambas as temperaturas, observou-se que a 4<sup>o</sup>C a cinética de reação é significativamente mais lenta que a 20<sup>o</sup>C. Esta influência foi verificada a partir dos 30 minutos de reação, pois no tempo de 15 minutos a área relativa à BPL a nas duas temperaturas foi similar. No tempo seguinte (30 minutos), verificou-se uma redução de área de aproximadamente três vezes a área relativa à BPL na reação a temperatura mais alta.

Quanto ao tempo de estabilização das reações observou-se que na reação a 4<sup>o</sup>C o tempo de estabilização foi de cerca de 120 minutos, enquanto na reação a 20<sup>o</sup>C a estabilização ocorreu aos 60 minutos. Quanto aos tampões, constatou-se que em tampão HEPES, em 15 minutos a reação entrou em equilíbrio e em tampão TRIS este tempo foi de 30 minutos.

Figura 25: Comportamento da BPL ( $300\text{mgL}^{-1}$ ) em meio aquoso a  $4^\circ\text{C}$  e  $20^\circ\text{C}$ , em tampão HEPES e em tampão TRIS a  $4^\circ\text{C}$  em função do tempo de reação.



A comparação dos coeficientes de correlação ( $R$ ) mostrados na Tabela 7 foi usada na avaliação do modelo que melhor descreve o processo de decaimento da BPL nos meios estudados. O método desenvolvido permitiu o cálculo da cinética de decaimento da BPL em meio aquoso a  $4^\circ\text{C}$  e a  $20^\circ\text{C}$  e em tampão TRIS a  $4^\circ\text{C}$ , mas não foi possível determinar o estudo em tampão HEPES, pois a reação alcançou o equilíbrio antes dos 15 minutos.

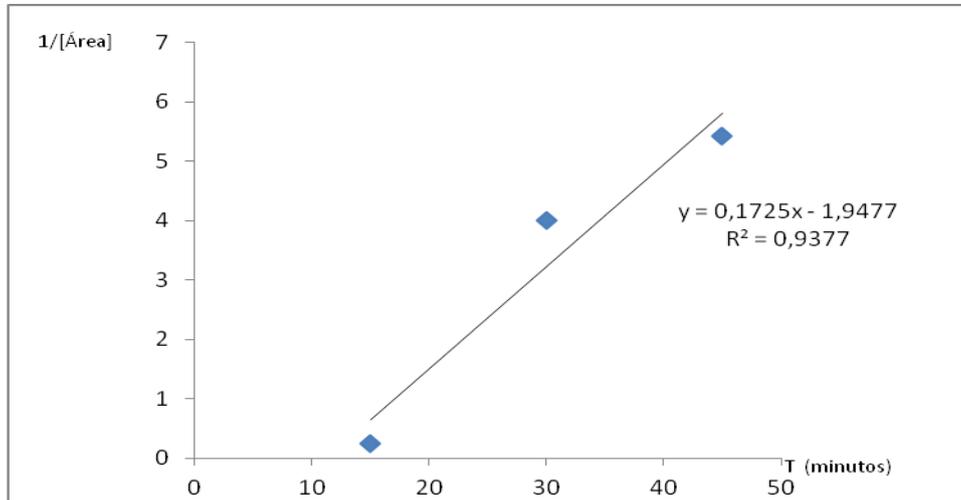
Tabela 7: Parâmetros de regressões lineares determinados empregando os modelos cinéticos de zero, primeira e segunda ordem

<b>Meio</b>	<b>Equação</b>	<b>R</b>
<b>Ordem zero</b>		
H <sub>2</sub> O 4°C	-0,121,1x + 12,442	0,9141
H <sub>2</sub> O 20°C	-0,1791x+11,85	0,7137
Tampão HEPES 4°C	-	-
Tampão TRIS 4°C	-0,1249+ 5,2003	0,7632
<b>Pseudo- primeira ordem</b>		
H <sub>2</sub> O 4°C	0,0203x + 2,9306	0,9972
H <sub>2</sub> O 20°C	-0,0522x + 3,015	0,9509
Tampão HEPES 4°C	-	-
Tampão TRIS 4°C	-0,102 + 2,4908	0,8242
<b>Pseudo segunda ordem</b>		
H <sub>2</sub> O 4°C	0,008x - 0,1347	0,9224
H <sub>2</sub> O 20°C	0,0301x - 0,5197	0,9717
Tampão HEPES 4°C	-	-
Tampão TRIS 4°C	0,1725x + 1,948	0,9377

Em tampão TRIS a cinética foi estimada com os dados obtidos até 45 minutos de reação, em função do equilíbrio estabelecido após esse tempo. A estimativa realizada com os dados obtidos entre 15 e 45 minutos revelaram que a equação de pseudo- segunda ordem forneceu os melhores ajustes dos dados experimentais,

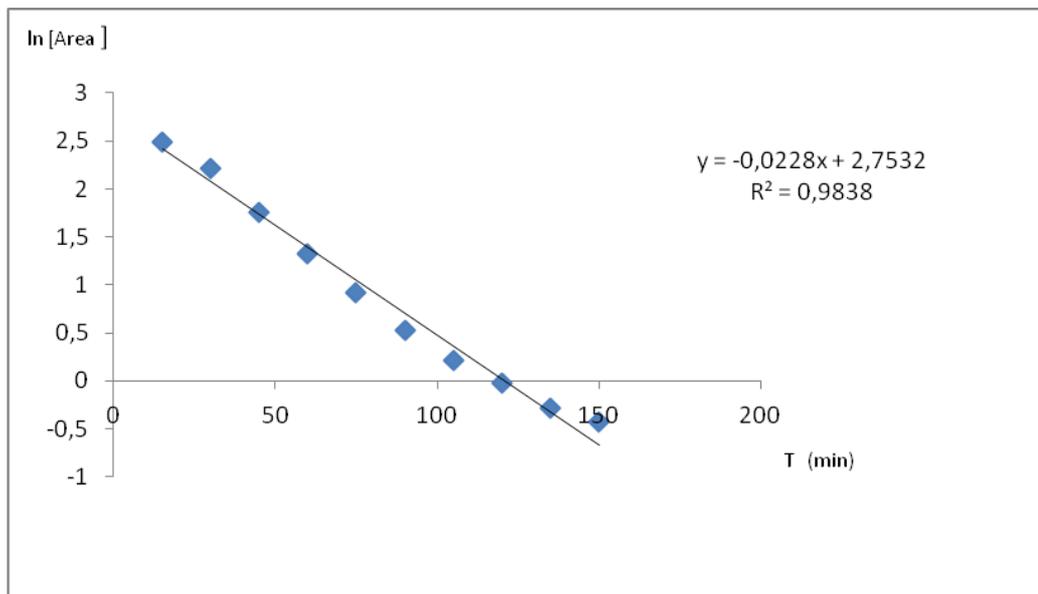
consequentemente, confirmando a dependência da velocidade da reação com o quadrado da concentração de BPL (figura 26).

Figura 26: Cinética da reação da BPL ( $300\text{mgL}^{-1}$ ) em tampão TRIS a  $4^{\circ}\text{C}$



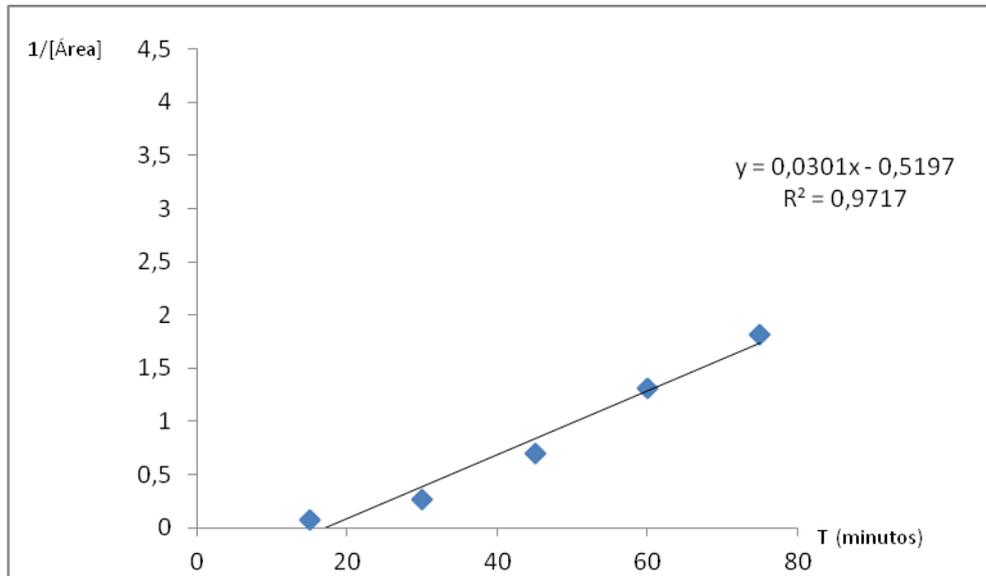
Em meio aquoso foi possível calcular a ordem das reações a  $20^{\circ}\text{C}$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . Para a reação a  $4^{\circ}\text{C}$  o modelo de pseudo primeira ordem foi o que melhor se adequou aos experimentos, esclarecendo que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da BPL (figura 27).

Figura 27: Cinética da reação da BPL ( $300\text{mgL}^{-1}$ ) em meio aquoso a  $4^{\circ}\text{C}$



Para a reação em meio aquoso a 20°C, o modelo que melhor ajustou-se foi o de pseudo segunda ordem, assim como ocorrido para os experimentos em tampão TRIS (Figura 28).

Figura 28: Cinética da reação da BPL (300mgL<sup>-1</sup>) em meio aquoso a 20°C



## 5 CONCLUSÕES

A necessidade de produzir uma vacina inativada contra o vírus da febre amarela com segurança e eficácia superior à apresentada pela vacina atenuada impulsionou o desenvolvimento de uma metodologia para acompanhar a decomposição da BPL, seguindo as tendências internacionais quanto à especificação de limite para presença desse agente inativante nas soluções virais.

A metodologia desenvolvida por CGAR-FID levou à imediata degradação da BPL. Esta teoria foi reforçada pelos resultados fornecidos pela espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , de forma que os experimentos foram conduzidos utilizando a CLAE-UV em fase reversa.

O método proposto permitiu determinar a existência de resíduo de BPL nas soluções estudadas no tempo estudado e a cinética de decomposição da BPL em meio aquoso a  $4^{\circ}\text{C}$  e a  $20^{\circ}\text{C}$  em tampão TRIS. Em tampão HEPES as reações ocorreram rapidamente impossibilitando a determinação da cinética. Neste meio, em 105 minutos não foi mais possível a detecção do analito. Nos demais meios estudados até 150 minutos ainda foi possível detectar resíduo BPL.

A BPL se decompôs em meio aquoso a  $4^{\circ}\text{C}$  seguindo um modelo de pseudo primeira ordem. Em meio aquoso a  $20^{\circ}\text{C}$  e em tampão TRIS, o decaimento da BPL foi bem descrito usando modelos cinéticos de pseudo segunda ordem. A mudança nos modelos de decaimento observados para a BPL a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$  comprovou experimentalmente o quanto temperatura a influencia nas reações da BPL e a diferença no comportamento da molécula nos dois tampões estudados comprovou a influência da natureza dos nucleófilos na estabilidade da molécula.

Os resultados obtidos mostraram que o método proposto pode ser utilizado de forma semi quantitativa, desde que seja determinado um limite máximo de BPL nas soluções virais contra febre amarela pelas agências reguladoras. Além disso, a metodologia desenvolvida pode contribuir na investigação do comportamento da BPL nas soluções virais visto o desconhecimento do mecanismo de ação deste agente inativante. O método precisa ser otimizado e validado para uso em rotina de

Controle da Qualidade da produção de vacina inativada contra o vírus da febre amarela de forma a garantir a segurança da vacina a ser oferecida à população.

## 6. PERSPECTIVAS

- Otimizar a metodologia desenvolvida por CLAE-UV, determinando suas figuras de mérito e, conseqüentemente, sua validação.
- Identificar os produtos da reação da BPL com os tampões estudados;
- Confirmar a formação do ácido 3- cloropropiônico;

## REFERÊNCIA

BRASIL, **Farmacopeia Brasileira**, volume 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, Anvisa, 2010.

CAMACHO L. , AGUIAR S., FREIRE S., LEAL L., NASCIMENTO J., IGUCHI T., LOZANA J., FARIAS R., **Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebocontrolledtrial**. Revista de Saúde Pública,39 (3): 413- 420, 2005.

CHIARADIA M., COLLINS C., E JARDIM I. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. *Quim. Nova*, vol. 31, no. 3, 623-636, 2008.

CHIONG MA. **Dr. Carlos Finlay and yellow fever**. The Journal of Clinical Investigation, 116, 10: 141, 1989.

**CHUST, Introdução a Cromatografia de Líquidos, Boletim SPQ, 39, 1990.**

CLARIDGE, T. **High-Resolution NMR Techinques in Organic Chemistry**. 2a.Oxford: Elsevier, 2009.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., **Cromatografia líquida de alta eficiência**. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, p 179 – 24, 1988.

DEGANI A, CASS Q., VIEIRA P., **Química Nova Na Escola Cromatografia N° 7**, Maio, 1998.

DIAS, J.M.S. **Quantificação de Furanos por Cromatografia Gasosa**, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 2009.

ENGVALL E, PERLMAN P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin**. G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-879.

ENGVALL E. **Enzyme immunoassay ELISA and EMIT**. *Meth. Enzymol* 70, 419 - 439, 1980.

FINLAY C. **El mosquito hipoteticamente considerado como agente de transmission de la fiebre amarilla**. *Anales de la Real Academia de Ciências Medicas Físicas Naturales*, 18: 147, 1881.

FISHBEIN, L., FLAMM, W. G., and FALK, H. L., "**Chemical Mutagens**", Academic Press, New York p. 215-216, 1970.

GRAVES JH. **Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus as applied to diseases**, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(1):23-27, jan-fev, 2009.

GRAVES JH. **Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus as applied to vaccine preparation**. American Journal of Veterinary Research, 24: 1131- 1135, 1963.

GUBLER DJ. **The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?** Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 27(5): 319-330, 2004.

HENNESSEN W. **Inactivation of poliovirus**. Dev Biol Stand, 47: 139-42, 1981.

HOLZGRABE U, **Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy** 57, 229–240, 2010.

HOLZGRABE U., MARTINO M. **Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—The NMR approach**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 679–687, 2011.

INCQS. Disponível em:  
<[http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=87&Itemid=95](http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=87&Itemid=95)>. Acesso em 12 de junho de 2015

JABOR AV, GALLER R, FREIRE M. **Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with and additional passage in chicken embryos**. Biologicals 2005: 1-7.

JADI R.S, SUDEEP A.B, BARDE PV, BARDE PV, MISHRA AC **Development of an inactivated candidate vaccine against Chandipura virus** Volume 29, Issue 28, 20 June, Pages 4613–461, 2011.

JONKER E., VISSER L, ROUKENS A. **Advances and controversies in yellow fever vaccination**, Ther Adv Vaccines. Nov; 1(4): 144–152, 2013.

KAMARAJ G., NARASUB M., SRINIVASAN V., **Validation of betapropiolactone (BPL) as an inactivant for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus**, Research in Veterinary Science 85 589–594, 2008.

LAMBERT O. BIHAN O., RONZON F., ADAMAX O., MEDINA J. **Treatment of influenza virus with Beta-propiolactone alters viral membrane fusion**. Biochimica et Biophysica Acta 1838 355–363, 2014.

LANÇAS, M. **Cromatografia em fase gasosa**, São Carlos Acta, 254p., 1993

- MARTIN M, TSAI TF, CROPP B, CHANG GJ, HOLMES DA, TSENG J, SHIEH W, ZAKI SR, AL-SANOURI I, CUTRONA AF, RAY G, WELD LH, CETRON MS. **Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases.**;358: 98-104, 2001.
- MARTINO M., HOLZGRABE U., **NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011.
- MASSE S., Anayse de la  $\beta$ -propiolactone par chromatografie gaz-liquide, *Journal of Chromatography*, 70, 128-134, 1972
- METZ, B. UITTENBOGAARD, J., HOOGERHOUT, P. **Reactions of Propiolactone with Nucleobase Analogues, Nucleosides, and Peptides**, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 286, NO. 42, pp. 36198–36214, October 21, 2011.
- MONATH T. **Yellow Fever**. In: **Vaccines** Plotkin, SA. e Mortimer, EA. Eds. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company, Harcourt Brace Javanovich, Inc. p.815-879, 1999.
- MONATH T., **Treatment of yellow fever**, *Antiviral Research* 78 116–124, 2008.
- MONATH T., **Yellow fever vaccine**. Review. *Expert Review Vaccines* 4(4) 1-22, 2005.
- MONATH, T. P., *et al.*: **Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity**. *Vaccine*, vol. 28, 3827–3840, 2010.
- MOOSBRUGGER GA. **Recherches expérimentales sur la fièvre aphteuse**. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 90: 176-198, 1948.
- OLIVEIRA A., MOTA L., NETO L, TAUIL P. **O que o reumatologista deve saber sobre a vacina contra Febre Amarela**, *Rev Bras Reumatol.* 53 (2): 206 – 210, 2013.
- OLIVEIRA A., MOTA L.,NETO L. TAUIL P. **O que o reumatologista deve saber sobre a vacina contra Febre amarela**, *Rev Bras. Reumatol.* 53 (2):206 – 210, 2013.
- PEDROSO, M., **Detecção em cromatografia gasosa rápida e cromatografia gasosa bidimensional abrangente** *Scientia Chromatographica* 3(2):145-154, 2011.
- PINHO G, A. NEVES A. E QUEIROZ M. **Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 987-995, 2009.
- PIOVESAN, M. F. **A construção política da agência nacional de vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz/ ENSP, 2002.

RACE E., CHRISTIAN A. STEIN, M. WIGG, B., ADDAWE M., FREZZAG P. and OXFORD. J. **A multistep procedure for the chemical inactivation of human immunodeficiency virus for use as an experimental vaccine**, Vaccine Volume 13 Number 16, 1995.

RIBEIRO C E SOUZA N., **Esquema Geral Para Elucidação De Substâncias Orgânicas Usando Métodos Espectroscópico E Espectrométrico**. Quim. Nova, Vol. 30, No. 4, 1026-1031, 2007.

SILVA, A.C.P. **O laboratório oficial na avaliação analítica**. In: Fundamentos da Vigilância Sanitária (Rozenfeld S., org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 271-301, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, F. X.; MORRIL, T. C. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

STRUCHINER C.J, LUZ PM, DOURADO I., SATO HK, AGUIAR SG, RIBEIRO JGL, SOARES RCR, CODEÇO CT. **Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine**. Epidemiology and Infection 132(5): 939-946, 2004.

SUCCI R., FARHAT C., **Vaccination in special situations**, Jornal de Pediatria - Vol. 82, N°3(Supl), 2006.

TAUIL P., **Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil**, Rev Saúde Pública, 2009.

TONHI E. COLLINS K, JARDIM I. E COLLINS C. **Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Em Fase Reversa (CIAE-FR) Baseadas Em Superfícies De Óxidos Inorgânicos Funcionalizados** Quim. Nova, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002.

VASCONCELOS P., **Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização**, Rev. Bras. Epidemiol. 244. Vol. 5, N° 2, 2002.

VASCONCELOS, P. **Febre amarela**, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(2):275-293, mar-abr, 2003.

VASCONCELOS, P. **Febre amarela silvestre: reemergência de transmissão no estado de São Paulo, Brasil, 2009**, Rev Saúde Pública;47(5):881-9, 2013.

VISENTAINER J. **Aspectos Analíticos da Resposta do Detector de Ionização em Chama Para Ésteres de Ácidos Graxos em Biodiesel e Alimentos** Quim. Nova, Vol. 35, No. 2, 274-279, 2012.

WHO. Global Programme for Vaccines and Immunization /Expanded Programme on Immunization. **Yellow fever**. Geneva 1998, Report series: 1-87.

WHO – World Health Organization. **Iniciative for vaccine Research 2004-2005.** Strategic Plan. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2004.

WHO. **Progress in the control of yellow fever.** Weekly Epidemiological Record; 80, 50-54, 2005a.

WHO . **Progress in the control of yellow fever in Africa.** Weekly Epidemiological Record; 80, 49-60, 2005b.

WHO. **Yellow Fever in 2003.** Weekly Epidemiological Record; 78: 349-360, 2003.

WHO. **Yellow fever situation in Africa and South America, 2005..** Weekly Epidemiological Record 81, 317-324, 2006.

BRICKS, L., **Vacinas e imunoglobulinas para imunodeprimidos,** Rev. Saúde Pública, 32 (3): 281-94, 1998.

ZILDA, P.S. & COROA, M.L. **Vigilância Sanitária: Um Histórico Discursivo,** 1998.