

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**IARALICE MEDEIROS DE SOUZA**

**Separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres na  
vacina meningocócica C conjugada brasileira utilizando  
eletroforese capilar**

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

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

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

S729

Souza, Iaralice Medeiros de.

Separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres na vacina meningocócica C conjugada brasileira utilizando eletroforese capilar. / Iaralice Medeiros de Souza. – Rio de Janeiro, 2011.  
xvi, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.  
Bibliografia: f. 81-89

1. Vacina conjugada. 2. Meningococo C. 3. Polissacarídeo. 4. Eletroforese capilar. I. Título.

CDD 616.82

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia Bacteriana em colaboração com o Laboratório de Alimentos e Contaminantes no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, sob a orientação da Dra. Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira.



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

IARALICE MEDEIROS DE SOUZA

**SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA E  
POLISSACARÍDEO LIVRES NA VACINA MENINGOCÓCICA C  
CONJUGADA BRASILEIRA UTILIZANDO ELETROFORESE  
CAPILAR**

Orientadora: Dra Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira

Dissertação aprovada em 06/06/2011

Examinadores:

  
Dra. Eliana Barreto Bergter  
UFRJ/Presidente

  
Dr. Marco Antonio Mota da Silva  
UEZO

  
Dr. Hilton Jorge do Nascimento  
Bio-Manguinhos/Fiocruz

Rio de Janeiro

2011

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por colocar em minha vida todas as pessoas presentes neste agradecimento e por guiar todos os meus passos.
  
- À minha querida mãe Vera, meu pai (in memoriam), meus irmãos Janaíne, Luana e Adalberto, minhas sobrinhas Loane, Letícia, Hellen, Ana Clara e Kamilly, pelo amor, compreensão, convivência, estímulo apoio e confiança nos meus objetivos.
  
- À Dra. Ivna Alana da Silveira pela orientação, amizade, confiança, otimismo e estímulo. Por sempre estar disposta a ensinar, ouvir, discutir e vibrar com cada resultado obtido. Por não me deixar desanimar em nenhum momento durante o desenvolvimento deste trabalho. Por querer sempre o melhor para o meu desenvolvimento profissional e lutar por isso.
  
- À Dra. Shirley Abrantes pela orientação e por todo o ensinamento na área de eletroforese capilar e validação. Obrigada pela amizade, discussões, conselhos, disponibilidade e pela maneira incrível como me recebeu em seu laboratório.
  
- Ao Dr. Milton Neto pelo auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Pela amizade, questionamentos, sugestões, discussões e muitos ensinamentos.
  
- À equipe do Laboratório de Tecnologia Bacteriana (Bio-Manguinhos) pela torcida, amizade e contribuição direta e indireta para a realização deste trabalho.
  
- À equipe do Laboratório de Alimentos e Contaminantes (INCQS) pela convivência, amizade, vibração, auxílio e torcida.

- Aos amigos queridos e sempre presentes: Carole, Kelly, Lulith, Lissa, Michelle, Nathália, Thaline, Suellen, Luiza, Rodrigo, Juliana, Daniel, Bruna e Guilherme. Muito obrigada por respeitar e entender meus momentos de ausência, pelo carinho e pelo estímulo constante.
  
- Aos colegas do Mestrado Profissional em Tecnologia em Imunobiológicos pelo carinho, apoio e pelos momentos de descontração, principalmente a Fernanda Martins, a irmã que eu escolhi e que me acompanha desde a faculdade.
  
- À Fundação Oswaldo Cruz e principalmente ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) pela oportunidade de ingressar no curso de mestrado.
  
- À Fiotec pelo apoio financeiro durante o mestrado.
  
- À coordenação e a secretaria do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, principalmente a Zaíra Antunes.
  
- Às amigas Michelle Clarina e Andréa Ayrosa pelo apoio constante e pela amizade desenvolvida nestes dois anos de convivência.
  
- A todos que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento desta dissertação.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<i>iv</i>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<i>ix</i>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<i>xi</i>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<i>xiv</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvi</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Vacinas polissacarídicas .....	4
1.2. Métodos de Conjugação.....	6
1.3. Vacinas Conjugadas .....	8
1.3.1. Vacina Meningocócica C Conjugada Brasileira .....	13
1.4. Controle de Qualidade de Vacinas Conjugadas .....	14
1.5. Métodos para separação e detecção de componentes livres em vacinas conjugadas.....	15
1.5.1. Eletroforese Capilar (EC).....	16
1.5.1.1. Fluxo eletroosmótico.....	18
1.5.1.2. Parâmetros Importantes na Separação por EC .....	19
1.5.1.2.1. Dimensão do Capilar.....	19
1.5.1.2.2. Temperatura .....	20
1.5.1.2.3. pH.....	20
1.5.1.3. Eletroforese Capilar de Zona (CZE) .....	20
1.5.1.4. Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC) .....	21
1.6. Validação de Métodos Analíticos .....	21
1.6.1. Seletividade .....	21
1.6.2. Linearidade .....	22
1.6.2.1. Efeito Matriz .....	23
1.6.3. Limite de Detecção (LOD) .....	23
1.6.4. Limite de Quantificação (LOQ) .....	24
1.6.5. Precisão.....	24
1.6.5.1. Repetitividade.....	24
1.6.5.2. Precisão Intermediária .....	25

1.6.5.3.	Reprodutibilidade .....	25
1.6.5.4.	Robustez .....	25
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1.	Objetivo Geral.....	26
2.2.	Objetivos Específicos.....	26
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1.	Equipamentos .....	27
3.2.	Materiais utilizados no equipamento.....	27
3.3.	Reagentes .....	28
3.4.	Amostras .....	28
3.4.1.	Polissacarídeo de <i>N. meningitidis</i> do grupo C .....	28
3.4.2.	Anatoxina Tetânica.....	29
3.4.3.	Conjugados .....	30
3.5.	Eletroforese Capilar .....	31
3.5.1.	Procedimentos Gerais .....	31
3.5.1.1.	Tratamento inicial dos capilares .....	31
3.5.1.2.	Condicionamento dos capilares .....	31
3.5.2.	Análise de Proteína Livre .....	32
3.5.2.1.	Estudo do modo de CZE.....	32
3.5.2.2.	Estudo do modo de MEKC .....	33
3.5.2.2.1.	Preparo do Tampão.....	33
3.5.2.2.2.	Preparo da Amostra .....	33
3.5.2.2.3.	Condições de análise estudadas.....	33
3.5.3.	Análise do Polissacarídeo Livre.....	34
3.5.3.1.	Condições analíticas de eletromigração estudadas no modo CZE .....	34
3.5.3.2.	Preparo do Tampão.....	34
3.5.3.3.	Preparo das amostras .....	35
3.5.3.4.	Cálculos dos pontos da curva analítica (desenho experimental).....	35
3.5.3.5.	Teste de Linearidade .....	36
3.5.3.6.	Avaliação do Efeito Matriz.....	37
3.5.3.7.	Repetitividade.....	37
3.5.3.8.	Precisão intermediária .....	38
3.5.3.9.	Robustez .....	39
3.5.4.	Quantificação de Lotes .....	39
3.5.4.1.	Construção da Curva de Adição Padrão.....	39
3.5.4.2.	Lotes Quantificados.....	40
3.5.5.	Análises estatísticas.....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1.	Condicionamento do capilar .....	41
4.2.	Análise da proteína livre.....	41
4.2.1.	Análises por CZE.....	42



4.2.2. Análises por MEKC .....	48
<b>4.3. Análise do Polissacarídeo .....</b>	<b>51</b>
4.3.1. Separação do Polissacarídeo Livre .....	51
4.3.2. Quantificação do Conteúdo de Polissacarídeo Livre .....	54
4.3.2.1. Confecção da Curva analítica em tampão .....	54
4.3.2.1.1. Teste de Linearidade .....	55
4.3.2.1.2. Teste de normalidade .....	56
4.3.2.1.3. Teste de Homogeneidade das variâncias dos resíduos .....	57
4.3.2.1.4. Teste de Independência de Resíduos .....	57
4.3.2.1.5. Análise de variância dos resíduos e desvio de linearidade .....	57
4.3.2.2. Confecção da curva analítica utilizando a Matriz .....	58
4.3.2.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	60
4.3.2.4. Avaliação da coluna de 40 cm .....	60
4.3.2.5. Avaliação da Repetitividade .....	61
4.3.2.6. Avaliação da Precisão Intermediária .....	62
4.3.2.7. Avaliação da Robustez .....	63
4.3.2.8. Quantificação do percentual de açúcar livre em diferentes lotes de conjugados .....	64
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA - Análise de Variância
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CD - Ciclodextrinas
- CE – Capillary Electrophoresis (Eletroforese capilar)
- CEC - Eletrocromatografia capilar
- Cetavlon - Brometo de hexadecil trimetil amônio
- CGE - Eletroforese capilar em gel
- CIEF - Focalização isoelétrica capilar
- CITP - Isotacoforese capilar
- CMC - Concentração micelar mínima
- CRM<sub>197</sub> - Variante não tóxica da toxina diftérica
- CZE – Free Zone Capillary Electrohoresis (Eletroforese Capilar de Zona Livre)
- DM - Doença meningocócica
- DOC - Desoxicolato de sódio
- EC - Eletroforese Capilar
- EDAC - Carbodiimida
- EUA - Estados Unidos
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- H. influenzae* - *Haemophilus influenzae*
- Hib - *H. influenzae* tipo b
- Ig – Imunoglobulina
- INCQS – Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia
- ISO - International Organization for Standardization (Organização Internacional de
- kV – Quilovolt
- LOD - Limite de Detecção
- LOQ - Limite de Quantificação

LSD – Least Significant Difference (Menor diferença significativa)

M - Molar

MEKC – (Micellar Micellar Electrokinetic Chromatography) Cromatografia eletrocinética micelar

mg - Miligramas

mL - Mililitros

mM - Milimolar

µm - Micrômetros

MMQO - Método dos mínimos quadrados ordinários

MPSV4 - Vacina polissacarídica quadrivalente

*N. meningitidis* - *Neisseria meningitidis*

NaOH – Hidróxido de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

OMV - Vesículas de membrana externa

Padronização)

PBS – Tampão fosfato de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – Ponto Isoelétrico

pKa – Constante de acidez

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRP - Polirribosil Ribitol Fosfato

PSC - Polissacarídeo meningocócico do grupo C

PSC-oxi – Polissacarídeo meningocócico do grupo C oxidado

PSC-TT - Conjugado

*S. pneumoniae* - *Streptococcus pneumoniae*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Si - Desvio padrão de precisão intermediária

TBNa - Tetraborato de sódio

TD - Anatoxina diftérica

TT - Anatoxina tetânica

TTH - Anatoxina tetânica ativada

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição dos principais grupos de *N. meningitidis* no Brasil, por região (SIREVA II 2009). .....4
- Figura 2 - Esquema representativo da ação das células B quando expostas a antígenos polissacarídicos (Pollard et al 2009). .....5
- Figura 3 – Esquema representativo da reação de conjugação utilizando a metodologia de aminação reductiva modificada. ....8
- Figura 4 – Esquema do reconhecimento do conjugado vacinal pelo sistema imune (Pollard et al 2009). .....9
- Figura 5 - Esquema de instrumentação para EC (Tavares 1996).....17
- Figura 6 - Representação química esquemática da superfície de um capilar de sílica fundida com formação de grupos carregados negativamente pela ionização de grupos silanol (SiOH). 19
- Figura 7 – Eletroferograma da análise do conjugado PSC-TT 0110 por MEKC utilizando como eletrólito Tampão TBNa 50 mM pH 9,2 acrescido de SDS 200 mM, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. ....42
- Figura 8 – Eletroferograma referente à introdução da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com acréscimo de CD 1 mM (azul) e 5 mM (vermelho). Condições de introdução: 50 mM TBNa, 10 mM SDS, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. ....42
- Figura 9 – Eletroferograma referente à análise do conjugado PSC-TT 0110 por CZE nas condições: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. ....43
- Figura 10a - Eletroferogramas sobrepostos referentes à avaliação da temperatura na análise de conjugado PSC-TT 0110 para a separação da proteína. Condição de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos, temperatura: 20°C (azul), 25°C (verde) e 30°C (marrom).....43
- Figura 10b - Eletroferogramas sobrepostos referentes à avaliação da temperatura na análise de conjugado para a separação de proteína. Conjugado PSC-TT 0110. Condição de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos, temperatura: 35°C (azul), 40°C (verde)

- e 45°C (marrom)..... 44
- Figura 11 - Eletroferogramas sobrepostos referentes às amostras de TTH 0110 (azul) e conjugado PSC-TT 0110 (verde) utilizando TBNa 50mM pH 9,3, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos.....44
- Figura 12 – Eletroferogramas sobrepostos referentes ao conjugado PSC-TT 0110 obtido no estudo de concentrações de tampão citrato em pH 5,2, tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. **Azul:** 10 mM; **Vermelho:** 30 mM; **Verde:** 50 mM..... 45
- Figura 13 - Eletroferogramas sobrepostos das amostras de conjugado lote PSC-TT 0110 (azul) e proteína TTH 0110 (vermelho), submetidas à análise em tampão citrato 10 mM com diferentes valores de pH: **A** - pH 4; **B** - pH 4,5; **C** – pH 5,2. Condições de análise: Tensão de 30 kV e temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 46
- Figura 14 - Eletroferograma da amostra do conjugado PSC-TT 0110 fortificado com TTH 0110 sob as condições de tampão citrato 10 mM, pH 5,2, tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 47
- Figura 15 - Eletroferograma contendo a sobreposição dos picos de TTH 0110 (azul) e TT 0509 (vermelho), através da análise em tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, tensão 30 kV, temperatura 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 48
- Figura 16 - Estudo da concentração de SDS na separação do conjugado PSC-TT 0110. Azul: 25 mM; Verde: 50mM. Condições de análise: Tampão TBNa 150mM, 30 kV, pH 9,3, 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 49
- Figura 17 – Eletroferogramas sobrepostos referentes ao estudo das concentrações do tampão TBNa pH 9,3 para a separação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 fortificada com TT 0509: **Azul:** 50 mM; **Verde:** 100 mM; **Marrom:** 150 mM.; **Verde escuro:** 200 Mm. Condições de análise: tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, acréscimo de SDS 25 mM. Análise em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 50
- Figura 18 – Eletroferogramas sobrepostos referentes à variação da temperatura da coluna na separação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 utilizando o tampão TBNa 150mM, SDS 25 mM, pH 9,3, tensão 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. **Azul:** 50°C; **Vermelho:** 55°C; **Verde:** 60°C..... 50
- Figura 19 - Eletroferograma referente à sobreposição da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com a TT 0509, nas condições obtidas de análise: TBNa 150 mM acrescido de SDS 25 mM, pH 9,3, tensão de 30 kV, temperatura de 60°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 51

- Figura 20 – Eletroferograma referente à fortificação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com a TT 0509, nas condições obtidas de análise: TBNa 150 mM acrescido de SDS 25 mM, pH 9,3, tensão de 30 kV, temperatura de 60°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 51
- Figura 21 – Estudo da influência do pH na separação do conjugado PSC-TT 0510. Marrom: pH 9,5; Azul: pH 10; Verde pH 10,5. Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos..... 52
- Figura 22 – Eletroferograma referente à amostra de conjugado PSC-TT 0510 no pH ótimo de análise. Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos..... 53
- Figura 23 – Sobreposição das análises das amostras de conjugado PSC-TT 0510 (azul) e do PSC-oxi 0210 (vermelho). Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 10, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos..... 53
- Figura 24 – Sobreposição das análises da amostra de conjugado PSC-TT 0510 (verde) e de sua ortificação com 20% de PSC-oxi 0210 (Azul). Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 10, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 54
- Figura 25 - Eletroferogramas sobrepostos referentes às concentrações de PSC-oxi 0210 usadas na confecção da curva analítica **A**: Verde 0,0235 mg/mL; Vermelho 0,047 mg/mL; Azul 0,070 mg/mL **B**: Rosa 0,094 mg/mL; Verde 0,1175 mg/mL; Vermelho 0,141 mg/mL; Azul 0,1645 mg/mL. Análise utilizando tampão TBNa 50 mM, pH 10,0, 30 kV, 40 °C ..... 55
- Figura 26 - Curva analítica final confeccionada em tampão mostrando a distribuição dos pontos da curva depois de retirados os valores aberrantes..... 56
- Figura 27 – Figura exploratória dos resíduos de regressão da curva analítica..... 56
- Figura 28 – Curvas de PSC-oxi 0210 confeccionadas no solvente e na matriz para a avaliação do efeito matriz..... 59
- Figura 29 – Eletroferograma referente à separação do conjugado PSC-TT 0510 na coluna de 40 cm. Condições de análise: TBNa 50 mM, SDS 25 mM, 30 kV, 40°C, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 60
- Figura 30 – Eletroferograma referente à fortificação da amostra de conjugado PSC-TT 0510 com o PSC-oxi 0210 na coluna de 40 cm. Condições de análise: TBNa 50 mM, SDS 25 mM, 30 kV, 40°C, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos..... 61
- Figura 31 - Eletroferograma referente ao perfil do conjugado PSC-TT 0111 analisado após 90 dias de estocagem..... 64

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estrutura dos polissacarídeos componentes da cápsula dos principais grupos de <i>N. meningitidis</i> (Adaptado de De Voe 1992). .....	2
Quadro 2- Características de vacinas conjugadas contra <i>N. meningitidis</i> do grupo C produzidas por diferentes fabricantes. ....	10
Quadro 3 - Amostras utilizadas na análise por eletroforese capilar com separação por lote, concentração de polissacarídeo (PSC), de proteína (TT), de proteína ativada (TTH) e data de obtenção. ....	30
Quadro 4 - Concentrações eqüidistantes utilizadas para a confecção da curva analítica e avaliação da faixa linear. ....	36
Quadro 5 – Resultados da análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ( $\alpha = 0,05$ ).....	57
Quadro 6 – Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO.....	58
Quadro 7 – Áreas encontradas na avaliação de efeito matriz nas análises em TBNa e no conjugado PSC-TT 0510. Em negrito, valores aberrantes retirados da análise. ....	59
Quadro 8 - Análise de repetitividade utilizando 4 introduções por tubo. ....	62
Quadro 9 – Resultados obtidos na análise de precisão intermediária realizadas por diferentes analistas em dias diferentes.....	63
Quadro 10 – Quantificação do PSC livre nos conjugados descritos, ressaltando a equação da reta, a concentração em mg/mL e o percentual deste componente presente no conjugado. ....	65

## RESUMO

*Neisseria meningitidis* do grupo C é uma bactéria encapsulada causadora de diversas doenças, está associada à altas taxas de mortalidade e portanto é de grande importância para a saúde pública. Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina conjugada formada pela ligação covalente do polissacarídeo capsular à anatoxina tetânica e esta vacina, atualmente, está sendo avaliada em estudos clínicos de Fase II em crianças de 1 a 9 anos. A quantificação de componentes livres como polissacarídeos e proteínas faz parte do controle de processo de vacinas conjugadas e tem o objetivo de evitar o aparecimento de reações adversas exacerbadas e/ou redução da imunogenicidade do componente vacinal. A Organização Mundial de Saúde preconiza níveis máximos de proteína livre no conjugado vacinal de 5%, mas não estabelece um limite máximo para o polissacarídeo livre para a vacina conjugada contra o grupo C. Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar métodos de controle de qualidade adequados para separar e quantificar estes componentes livres presentes na vacina meningocócica C conjugada brasileira, utilizando a técnica de eletroforese capilar (EC). Para a separação da proteína livre foram comparados os modos de eletroforese capilar de zona livre (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). Diferentes condições de migração da amostra variando-se parâmetros como pH, temperatura, tensão, concentração do tampão, ciclodextrinas e de surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) foram estudadas. Os resultados demonstraram que a melhor separação do conjugado foi obtida por MEKC utilizando tampão tetraborato de sódio (TBNa) 150 mM, 25 mM de SDS, 60°C, 30 kV e pH 9,3. Entretanto, nos modos de EC estudados não foi possível obter a separação completa dos componentes, sendo necessária a utilização de outro processo. Por outro lado, por CZE foi possível observar a separação da proteína ativada da nativa, demonstrando a necessidade de otimização da reação de ativação da proteína, a fim de aumentar o rendimento da reação de conjugação. A separação completa do açúcar livre presente no conjugado foi obtida empregando CZE utilizando tampão TBNa 50 mM, 40°C, 30 kV e pH 10. Com as condições escolhidas foi possível determinar o conteúdo de polissacarídeo livre nos lotes de conjugado e validar o método proposto, que se mostrou linear na faixa de 0,047 a 0,164 mg/mL, apresentou efeito matriz, 0,0154 mg/mL de limite de detecção e 0,0454 mg/mL de limite de quantificação. Após as etapas de validação, foram quantificados alguns lotes de conjugado e observou-se um alto teor de açúcar livre nos lotes com longo período de estocagem a 4°C. Desse modo, fez-se a avaliação de um lote recentemente produzido e obteve-se o valor de 19,08% de polissacarídeo livre. A fim de estimar o tempo de estocagem máximo do conjugado foram realizadas análises com 30, 60 e 90 dias de estocagem a 4°C. Os valores encontrados até 60 dias não foram significativamente diferentes dos determinados no tempo zero. No entanto, com 90 dias de estocagem ocorreu uma modificação do perfil do conjugado que impossibilitou a sua quantificação. A metodologia desenvolvida e validada será introduzida no controle de qualidade do lote de conjugado que será submetido aos estudos clínicos de Fase III e na rotina da vacina conjugada estudada. Além disto, o conhecimento adquirido poderá ser empregado no controle de qualidade de outras vacinas conjugadas contra bactérias encapsuladas de interesse epidemiológico no país.



## ABSTRACT

*Neisseria meningitidis* group C is an encapsulated bacterium that causes several diseases and is associated with high mortality rates becoming a serious public health problem. Bio-Manguinhos is developing a conjugate vaccine constituted by covalent attachment of capsular polysaccharide to tetanus toxoid, which is currently being evaluated in Phase II clinical studies in children between 1-9 years. Free components quantification is a vaccine process control assay and intended to prevent exacerbated adverse reactions occurrence and/or vaccine immunogenicity reduction. The World Health Organization recommends 5% of free protein maximum level in the conjugate vaccine, but does not set a limit for the free polysaccharide contents. Thus, the aim of this study was to develop and validate quality control methods appropriate to separate and quantify free components present in the conjugate vaccine against *N. meningitidis* group C, using capillary electrophoresis (CE) technique. For free protein separation, free capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) were compared and different sample migration conditions were studied by varying parameters such as pH, temperature, voltage, buffer concentration, cyclodextrin and surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). The results showed that the best separation was obtained by MEKC using sodium tetraborate buffer (TBNA) 150 mM, 25 mM SDS, 60°C, 30 kV and pH 9.3. However, the CE did not induce a complete separation of the components suggesting that other techniques should be necessary. On the other hand, native and activated protein separation was possible using CZE, demonstrating the necessity of optimize protein activation reaction in order to increase the conjugation reaction yield. The total free sugar conjugate was completely separated from the conjugate by CZE using 50 mM TBNA buffer, 40°C, 30 kV and pH 10. In these conditions it was possible to determine the free polysaccharide content and validate the proposed method, which was linear in 0.047 to 0.164 mg/mL range, showed a matrix effect, 0.0154 mg/mL of detection limit and 0.0454 mg/mL of quantification limit. After the validation steps, some conjugate batches were quantified and high levels of free sugar were observed in batches stored at 4°C for long periods. On the other hand a conjugate batch recently produced was evaluated and showed 19.08% of free polysaccharide. In order to estimate the maximum storage time a conjugate batch was analyzed 30, 60 and 90 days after the production steps. The values found up to 60 days were not significantly different from that one determined at the initial time. However, with 90 days of storage there was a change in the conjugate profile that impaired its quantification. The methodology developed and validated will be used to evaluate the conjugate batch that will be submitted to Phase III clinical studies and in the routine quality control of the conjugate vaccine. Moreover, the acquired knowledge could be used in quality control of other conjugate vaccines against encapsulated bacteria of epidemiological importance in the country.

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias encapsuladas *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) e *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) são constantemente associadas a casos de pneumonia, otite, bronquite e conjuntivite. A meningite é a forma mais grave de infecção causada por estas espécies bacterianas, acometendo, principalmente, crianças de até dois anos de idade (Van der Beek et al 2004).

Estes microrganismos têm em comum a presença de uma cápsula polissacarídica que varia entre as espécies, sendo responsável pela determinação da virulência e por ajudar o patógeno a estabelecer a infecção. Os polissacarídeos capsulares são também usados para definir sorotipos ou grupos de muitas espécies bacterianas, sendo descrito o papel fundamental dos anticorpos contra estas moléculas no controle da infecção (Goldblatt 2000). A cápsula polissacarídica dificulta o reconhecimento da bactéria pelo sistema imunológico do hospedeiro podendo inibir a ativação do complemento e a eliminação da célula bacteriana (Roitt 1997).

*N. meningitidis* é uma bactéria Gram negativa que se apresenta normalmente na forma de diplococcos. A cápsula da *N. meningitidis* serve de base para a classificação deste microrganismo em 13 diferentes grupos, de acordo com suas diferenças imunológicas (A, B, C, 29E, H, I, K, L, M, W-135, X, Y e Z). Os grupos mais frequentemente associados à doença meningocócica (DM) são os grupos A, B, C, Y e W-135 que possuem cápsula polissacarídica constituída de homopolímeros de ácido siálico (grupos B e C), unidades de manosaminafosfato (grupo A) e heteropolímeros de ácido siálico e glicose (grupo Y) e galactose (grupo W-135), conforme mostrado no Quadro 1 (Frasch 1995; Poolman 1995).

Os grupos B e C são responsáveis pela maioria dos casos da doença na Europa e Américas, com mais de 50% dos casos sendo causados pelo grupo B (Donaldson et al 1999), enquanto os grupos A e C predominam na Ásia e África (Schwartz et al 1989;

WHO 1995; Connolly e Noah 1999). O grupo B, nos países desenvolvidos, predomina em crianças abaixo de quatro anos, o grupo A em crianças em idade pré-escolar e o grupo C em adolescentes e adultos jovens.

*Quadro 1* - Estrutura dos polissacarídeos que constituem a cápsula dos principais grupos de *N. meningitidis* (Adaptado de De Voe 1992).

Grupos	Unidades
A	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-ManpNAc-1( PO}_4\rightarrow$
B	$\rightarrow 8)-\alpha\text{-D-NeupNAc-(2 } \rightarrow$
C	$\rightarrow 9)-\alpha\text{-D-NeupNAc-(2 } \rightarrow$
Y	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Glc-(1 } \rightarrow 4)-\alpha\text{-D-NeupNAc-2} \rightarrow$
W-135	$\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-Gal-(1 } \rightarrow 4)-\alpha\text{-D-NeupNAc-2} \rightarrow$

Na África, abaixo do deserto do Sahara, numa região de savana que vai do leste da Etiópia ao oeste do Senegal, conhecida como cinturão da meningite, a incidência da DM tem caráter epidêmico e é causada pelo grupo A. Nos anos de 2009 e 2010 o grupo X tem sido associado a um grande número de casos de doença meningocócica, maior do que àquele causado pelo grupo A, em adolescentes de Burkina Faso, na África. Desta forma, o número de casos de DM induzidos pelo grupo X alcançou níveis epidêmicos no mundo, o que estimula o desenvolvimento de vacinas efetivas para o controle dos surtos. Estes dois grupos têm se alternado na indução de DM no cinturão da meningite, onde a doença ocorre em ondas epidêmicas (Nathan et al 2007; Bröker e Veitch 2009; Mutonga et al 2009). A taxa de mortalidade da DM é de aproximadamente 10%, com a indução de altas taxas de DM de 100-500/100.000 na região do cinturão da

meningite (WHO 1998; Molesworth et al 2002; Joshi et al 2009; LaForce et al 2009).

Nos Estados Unidos (EUA), cerca de 3,9 a cada 100.000 crianças com idade inferior a um ano são acometidas pela DM, sendo 31,5% causada por bactérias pertencentes ao grupo B, 34% ao grupo Y e 28% ao grupo C (Marchant 2010). Neste país, foi ainda observada uma maior incidência da DM em pessoas com idade inferior a 25 anos, verificando-se, também um aumento da mortalidade em crianças, adultos jovens e idosos (Sharip et al 2006).

No Brasil, a doença meningocócica é endêmica, com casos esporádicos durante todo o ano. Nos anos 70, a maioria dos casos registrados foi determinada pelos grupos A e C. Na década de 80, o grupo B passou a ser o mais freqüente e, nos últimos 20 anos, houve também um aumento na incidência do grupo C, principalmente na indução de surtos em diferentes regiões do país, o que justifica o desenvolvimento brasileiro de vacinas contra estes grupos de *N. meningitidis*.

Atualmente, a incidência da doença é de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes e a letalidade de 10 a 20% (SINAN/CVE 2011), onde o grupo B é responsável por 20,6% dos casos de DM e o grupo C induz 71% dos casos restantes que são notificados, na maioria das regiões do país (SIREVA II 2009) (Figura 1).

A importância do estudo de estratégias para prevenir infecções causadas por bactérias encapsuladas está na alta incidência de doenças invasivas severas em crianças com idade inferior a dois anos, por estas possuírem uma resposta imunológica adequada contra essas bactérias. Deste modo, a fim de reduzir a incidência destas doenças são utilizadas vacinas polissacarídicas e conjugadas a proteínas carreadoras (Ahmad e Chapnick 1999; Jacobs et al 2009).

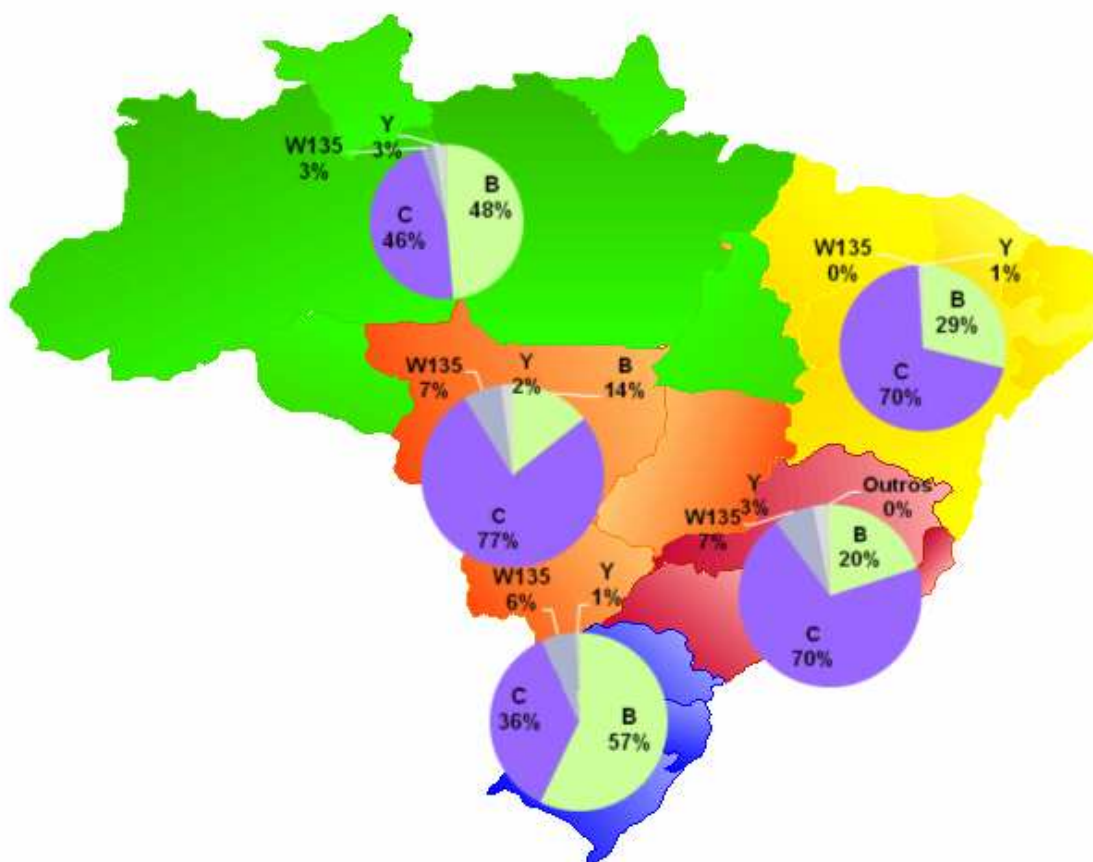


Figura 1 - Distribuição dos principais grupos de *N. meningitidis* no Brasil, por região (SIREVA II 2009).

### 1.1. Vacinas polissacarídicas

As vacinas polissacarídicas foram as primeiras a serem definidas quimicamente, sendo utilizadas para a prevenção de doenças causadas por bactérias encapsuladas. Estas vacinas são produzidas a partir polissacarídeos com alto peso molecular, e são constituídas por epítomos repetidos que não são processados por células apresentadoras de antígeno, sendo classificados como antígenos T independentes do tipo 2. Desta maneira, estes antígenos interagem diretamente com células B, induzindo a produção de anticorpos sem a ação de células T (Figura 2).

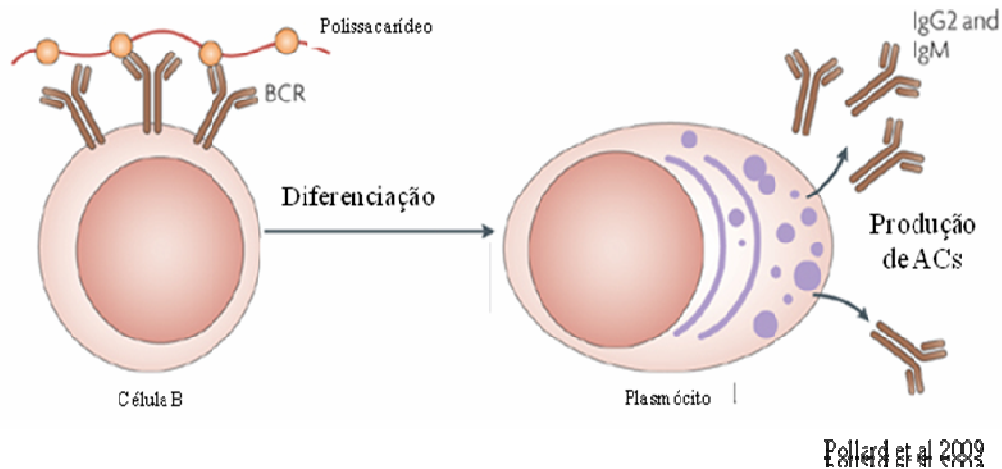


Figura 2 - Esquema representativo da ação das células B quando expostas a antígenos polissacarídicos (Pollard et al 2009).

Em crianças menores que 18 meses as células B, responsáveis pelo reconhecimento de polissacarídeos, ainda não estão formadas, o que impede a indução de resposta imunológica tanto para o microrganismo quanto para os polissacarídeos presentes na vacina. Desta forma, a imunização utilizando polissacarídeos é efetiva em indivíduos maiores de dois anos de idade. Entretanto, a resposta ainda é restrita, havendo predominância de anticorpos IgM e IgG2, que não são bons ativadores de complemento.

A resposta observada contra as vacinas polissacarídicas apresenta falha na indução de memória imunológica, na maturação da avidéz dos anticorpos e também na mudança de classe de imunoglobulinas (Ahmad e Chapnick 1999). Estas vacinas continuam sendo utilizadas em alguns países do mundo - mesmo apresentando menor eficácia – em casos de epidemias, por serem mais baratas e seguras (Plans 2002; Fleck 2003).

As vacinas disponíveis contra a doença meningocócica são constituídas, principalmente, por antígenos da cápsula da bactéria, exceto para o grupo B, no qual é utilizada uma abordagem protéica, como a utilização de vesículas de membrana externa (OMV), porque a cápsula deste grupo não é antigênica. As vacinas polissacarídicas foram desenvolvidas na década de 70 e apresentam algumas desvantagens como a oferta de proteção por tempo limitado (cerca de três anos) com

reduzida eficácia em crianças de baixa idade (particularmente abaixo de dois anos). Entretanto, estas vacinas ainda são utilizadas em casos de surtos de DM.

Atualmente, utiliza-se nos EUA a vacina polissacarídica quadrivalente (MPSV4) licenciada em 1981, que contem 50 µg de cada polissacarídeo capsular purificado (A, C, Y e W-135). Esta vacina é administrada em dose única, não sendo indicada para crianças menores que 2 anos, exceto para proteção a curto prazo contra o meningococo A em crianças maiores de 3 meses (Menomune 2005).

No Brasil, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), unidade produtora de imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz, foi criado em 1976, com a intenção de produzir e distribuir vacinas polissacarídicas A e C, sendo responsável pelo fornecimento destas ao Ministério da Saúde. E, atualmente, Bio-Manguinhos se encontra em processo de cooperação técnica com um instituto de pesquisa em Cuba para a produção e fornecimento da vacina polissacarídica combinada A, C e W para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a fim de suprir a necessidade de alguns países africanos.

Em contraste aos polissacarídeos, a resposta mediada por anticorpos contra antígenos protéicos apresenta recrutamentos efetivos de células T, tendo como consequência, a resposta ao antígeno protéico em crianças menores que dois anos e resposta imunológica duradoura, com geração de memória imunológica (Jones 2005). A fim de unir a resposta imunológica completa gerada por antígenos protéicos à especificidade do antígeno polissacarídico, foram desenvolvidas vacinas formadas pela ligação covalente de polissacarídeos a proteínas carreadoras que podem ser homólogas ou heterólogas.

## **1.2 Métodos de Conjugação**

O processo de conjugação a um carreador protéico, utilizado para a produção de vacinas visa aumentar a imunogenicidade do antígeno polissacarídico de maneira a induzir uma resposta imunológica mais efetiva e duradoura. Para isso, podem ser utilizados diversos métodos de conjugação, e deve-se escolher adequadamente o tipo e

a natureza das moléculas que irão participar da reação de conjugação.

A proteína carreadora deve apresentar algumas características que justifiquem a sua escolha, dentre elas o elevado caráter imunogênico, grupamentos funcionais capazes de serem conjugados ao polissacarídeo, razoável solubilidade e elevado grau de pureza (WHO 2000; WHO 2004). Já o polissacarídeo deve manter seu caráter antigênico e conter um número sequencial não modificado de unidades repetidas dentro da cadeia, para que seja mantida a estrutura adequada capaz de induzir a produção de anticorpos contra o polissacarídeo original.

Para a produção destas vacinas são utilizados, preferencialmente, métodos de conjugação que não utilizem espaçadores, como a técnica de aminação reductiva e da carbodiimida (Hermanson 1996). A primeira vacina conjugada utilizada contra a infecção causada por *H. influenzae* tipo b (Hib) foi desenvolvida a partir da técnica da carbodiimida (Schneerson et al 1980). A ligação de polissacarídeo à proteína geralmente não ocorre de maneira direta, necessitando da geração de grupamentos reativos. No caso do polissacarídeo capsular de Hib são realizadas modificações químicas, como a ativação prévia de grupos carboxílicos da proteína, seguindo-se o acoplamento com os grupos hidrazidas gerados no polissacarídeo (Chu et al 1983; Lindberg 1999). Um dos problemas dessa estratégia de conjugação é o grande número de grupos reativos desnecessariamente gerados após a formação do conjugado que podem induzir à obtenção de estruturas antigênicas novas e indesejáveis na molécula obtida (DiFabio 1988).

O método de aminação reductiva foi empregado pela primeira vez para a obtenção de glicoconjugados em 1981, quando Jennings e Lugowski conjugaram algumas proteínas como a albumina sérica bovina e a anatoxina tetânica (TT) aos polissacarídeos meningocócicos. A formação da ligação covalente entre as moléculas foi possível devido à introdução prévia de grupamentos aldeído no polissacarídeo. Através desse método, os pesquisadores conseguiram obter um imunógeno melhor definido, sem a formação de ligações cruzadas e com menor manipulação química do polissacarídeo (Jennings e Lugowski 1981). Dentre as vantagens citadas para este método, estão a de ser um meio direto de ligação entre oligo ou polissacarídeos e os



grupamentos amino de proteínas, passível de ocorrer em meio aquoso, e em condições reacionais brandas, resultando em uma conjugação onde as unidades monossacarídicas encontram-se mais expostas ao sistema imunológico.

Entretanto este método possui uma séria desvantagem relacionada ao longo tempo de reação necessário para a obtenção completa dos conjugados, podendo durar de dois a três dias (Costantino et al 1992; Pawlowski et al 2000; Wang et al 2003; Carmenate et al 2005; Lees et al 2006). A ineficiência da reação pode ser diminuída utilizando o método de aminação reductiva modificada, com a introdução de grupos hidrazida na proteína, que reagem mais favoravelmente com os grupos aldeídos gerados no polissacarídeo, através da reação com cloridrato de hidrazina, reduzindo o tempo da reação de conjugação (Jennings & Lugowski 1981; Lee e Frasch 2005; Jessouroun et al 2005; Silveira et al 2007). Esta estratégia foi a escolhida por Bio-Manguinhos para o desenvolvimento da vacina meningocócica C conjugada brasileira e está esquematizada na Figura 3.

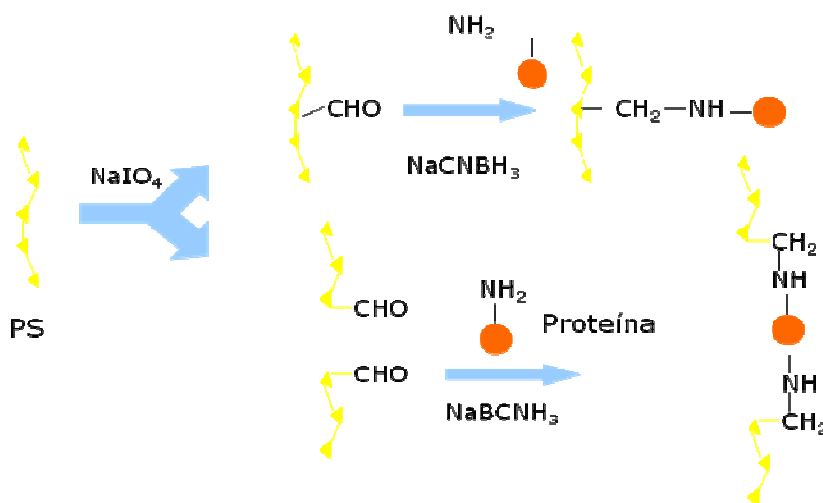
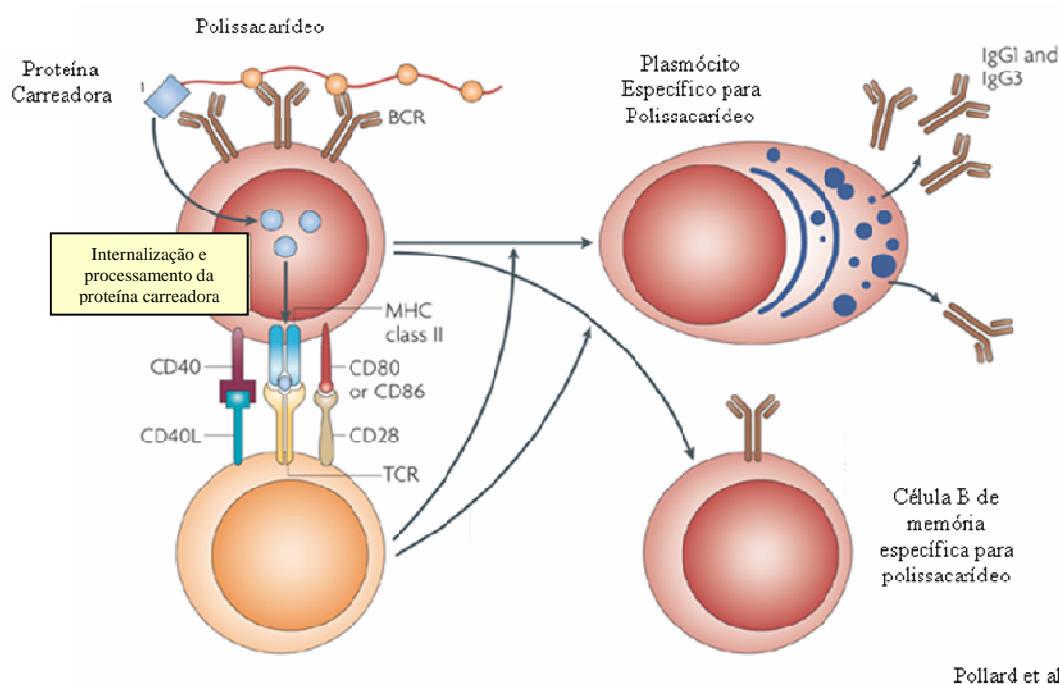


Figura 3 – Esquema representativo da reação de conjugação utilizando a metodologia de aminação reductiva modificada.

### 1.3 Vacinas Conjugadas

A descoberta de Avery & Goebel (1929) permitiu o aumento da imunogenicidade dos polissacarídeos através de ligação covalente entre estes e uma proteína

carreadora, formando um conjugado. Este conjugado é capaz de promover uma resposta dependente de célula T contra o polissacarídeo. Através desta associação, permitiu-se o desenvolvimento de memória imunológica, aumento da avidéz dos anticorpos e mudanças de isotipo de imunoglobulinas (Wuorimaa et al 2001; Jones 2005) (Figura 4).



Pollard et al 2009

Figura 4 – Esquema do reconhecimento do conjugado vacinal pelo sistema imune (Pollard et al 2009).

Diferentemente do que ocorre com as vacinas polissacarídicas, as vacinas conjugadas promovem uma proteção duradoura. Além disto, a utilização de vacinas conjugadas é capaz de reduzir o estado de portador assintomático, diminuindo assim a transmissão dos microrganismos. Em função disto, este tipo de resposta é reconhecido como imunidade de rebanho e é responsável pelo controle efetivo das doenças causadas por bactérias encapsuladas que colonizam a naso-faringe dos hospedeiros (Bröker e Veitch 2009).

Mesmo sendo conhecida a imunogenicidade do conjugado hapteno-proteína carreadora, desde 1929, apenas nos anos 80, foi desenvolvida uma vacina utilizando

este conceito. O uso de vacinas conjugadas foi licenciado em 1987, com a vacina contra Hib, mostrando-se mais efetiva em crianças com idade inferior a 2 anos do que a vacina polissacarídica anteriormente utilizada, gerando também queda na incidência de infecções invasivas por esta bactéria.

Posteriormente, outras vacinas conjugadas foram licenciadas, como uma contra *N. meningitidis* do grupo C e uma vacina heptavalente contra *S. pneumoniae*. Outras vacinas se encontram em fase de desenvolvimento.

Na produção do conjugado utilizam-se, preferencialmente, proteínas imunogênicas já conhecidas como o TT e a anatoxina diftérica (TD), que são liberadas para o uso em humanos. Entretanto, utiliza-se também CRM<sub>197</sub> (uma variante não tóxica da toxina diftérica), OMV de *N. meningitidis*, e mais recentemente a proteína D derivada de *H. influenzae* (Oosterhuis-Kafeja et al 2007).

Algumas vacinas conjugadas contra meningococo do grupo C são produzidas utilizando diferentes tipos de proteínas carreadoras, como apresentado no Quadro 2.

*Quadro 2*- Características de vacinas conjugadas contra *N. meningitidis* do grupo C produzidas por diferentes fabricantes.

Vacina	Fabricante	Proteína carreadora	Concentração PSC/dose	Concentração proteína/dose
NeisVac-C	Baxter	Anatoxina tetânica	10 µg	10-20 µg
Menjugate	Novartis	CRM-197	10 µg	12,5-25 µg
Meningitec	Pfizer	CRM-197	10 µg	15 µg
Mentorix	GSK	Anatoxina tetânica	5 µg	5 µg
MenC-Bio	Bio-Manguinhos	Anatoxina tetânica	10 µg	10-30 µg

Atualmente, as vacinas conjugadas contra as bactérias encapsuladas têm sido estudadas em combinação com outras vacinas já existentes no calendário de imunização de diversos países. O objetivo destas combinações é facilitar a administração das vacinas, através da diminuição do número de injeções e reduzir custos. As vacinas conjugadas combinadas poderiam também auxiliar na redução da concentração total dos carreadores protéicos, principalmente TT e TD, o que pode

acabar por inibir possíveis eventos adversos da administração de vacinas utilizando a mesma proteína carreadora.

Muitos autores demonstram o papel da proteína na hiporresponsividade observada na administração de mais de uma vacina conjugada com o mesmo carreador (Dagan et al 1998). Entretanto, outros experimentos demonstram o aumento da produção de anticorpos anti-Poliribosil Ribitol Fosfato (PRP) em crianças que receberam tanto a vacina contra Hib quanto a contra *N. meningitidis* do grupo C, ambas as vacinas contendo a mesma proteína carreadora (Tejedor et al 2006). Pöllabauer et al (2009) acreditam que as contrastantes respostas observadas são determinadas pelas diferentes quantidades totais de proteínas carreadoras presentes nas vacinas.

Deste modo, acredita-se que a redução da resposta imunológica pela administração de vacinas conjugadas com o mesmo carreador protéico se deve à supressão induzida pela proteína carreadora em questão (Herzenberg et al 1982). A supressão do epítipo é definida como uma interferência na resposta de anticorpos contra o hapteno conjugado à proteína carreadora e ocorre em indivíduos previamente imunizados com a mesma proteína (Renjifo et al 1998). Acredita-se que o mecanismo seja desencadeado pela estimulação excessiva de células T pela proteína carreadora. Desta maneira, as células T que deveriam ser ativadas por contato com os polissacarídeos capsulares conjugados à proteína, não o são de maneira efetiva e, como resultado, observa-se um aumento na resposta contra o carreador e uma diminuição da resposta contra os polissacarídeos conjugados.

Petters e colaboradores (1991) estudaram o efeito imunológico da utilização de vacinas conjugadas fazendo a imunização prévia com a proteína carreadora (TT e TD). Observou-se que a pré-imunização com doses pequenas de TT aumentou a resposta de anticorpos contra antígenos polissacarídicos de *S. pneumoniae* tipo 4 e *N. meningitidis* grupo C. A pré-imunização com altas doses de TT inibiu a resposta de anticorpos anti-polissacarídeo conjugados. Observou-se também que não há efeito na resposta humoral contra o polissacarídeo quando se faz a pré-imunização utilizando TD.

Além da supressão pelo epítipo, o excesso de proteína carreadora pode induzir

o aparecimento de eventos adversos exacerbados, incluindo reações locais, alergia, febre, dor de cabeça, urticária e parestesia. Dependendo da dimensão destes efeitos adversos, a utilização da vacina pode ser impedida (Joshi et al 2009).

Dagan e colaboradores (2010) descreveram mecanismos de interferência na resposta a vacinas conjugadas, podendo esta interferência ser positiva, como ocorre no caso da administração da vacina Hib conjugada com TT. A combinação desta vacina conjugada com a mesma proteína carreadora levou ao aumento da concentração de células T auxiliares. Por outro lado, os autores também demonstraram o mecanismo de supressão do epítipo induzido pela proteína carreadora. Este mecanismo pode ser desencadeado por quantidades pré-existentes de anticorpos contra a proteína carreadora, impedindo o acesso do hapteno às células B, favorecendo a resposta contra a proteína carreadora ao invés da resposta contra o hapteno.

A presença de níveis altos de polissacarídeo livre reduziria o ganho obtido no desenvolvimento das vacinas conjugadas, já que o seu excesso possivelmente levaria a uma menor apresentação do antígeno a células T, o que tornaria a vacina menos eficiente. Já é descrita a hiporresponsividade após exposição repetida à vacina polissacarídica de *N. meningitidis* do grupo C, em crianças, adolescentes e adultos, sendo relatados casos deste mesmo efeito para os grupos A, Y e W-135 (Roitt 1997; MacLennan et al 1999; Richmond et al 2000; Al-Mazriou et al 2009). Este efeito está relacionado à diminuição da resposta de anticorpos contra o polissacarídeo capsular, Entretanto, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual ocorre a hiporresponsividade após administração de vacinas polissacarídicas. No entanto, sabe-se que este estado pouco responsivo pode ser revertido através da administração de uma vacina conjugada que utilize o mesmo tipo de polissacarídeo (Richmond et al 2000). Alguns autores descreveram que adultos e crianças expostos previamente à vacina polissacarídica apresentavam um menor título de anticorpos bactericidas do que pessoas que não foram vacinadas, em resposta a uma dose da vacina conjugada (Borrow et al 2001; Keyserling et al 2005). Por outro lado, vários pesquisadores discutiram o emprego de vacinas polissacarídicas, em estudos clínicos, como grupo controle e também como dose reforço para avaliar a eficiência das vacinas conjugadas.

Mais recentemente Granoff e Pollard (2007) sugeriram que a diminuição da resposta ao antígeno após administração de dose reforço, com vacinas polissacarídicas, ocorra devido à diferenciação de células B de memória em células produtoras de anticorpos após estímulo com o polissacarídeo. Como este antígeno não é capaz de estimular a produção de novas células B de memória ocorre então o comprometimento da resposta imunológica. Dessa forma, esses autores não recomendam a utilização de vacinas polissacarídicas em casos onde há a disponibilidade de vacinas conjugadas.

### **1.3.1. Vacina Meningocócica C Conjugada Brasileira**

Motivado pelo quadro epidemiológico brasileiro e pela larga experiência na área de vacinas polissacarídicas contra meningococos, Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina meningocócica C conjugada brasileira, desde 2000, utilizando o método modificado de aminação redutiva com TT (Silveira et al 2007). Em etapas anteriores foram realizadas a caracterização físico-química, biológica e a avaliação imunológica dos conjugados, obtidos em diferentes escalas, utilizando-se o método modificado de aminação redutiva e etapas de purificação, que envolvem componentes de inovação tecnológica (Jessouroun et al 2005; Bastos 2005; Silveira 2007; Rodrigues 2009; Bastos et al 2010). A vacina conjugada apresentou resultados satisfatórios de reatogenicidade e imunogenicidade em indivíduos saudáveis, em estudos clínicos de Fase I realizados em 2009, em comparação com uma vacina comercial e no presente momento está sendo avaliada em estudos clínicos de Fase II em crianças de 1 a 9 anos de idade.

Na produção deste tipo de vacina são utilizadas diferentes tecnologias de ponta para a obtenção de produtos com alto valor agregado, empregando-se grande investimento na capacitação de pessoas, em diferentes áreas. Bio-Manguinhos é a primeira instituição brasileira com iniciativa na área de desenvolvimento de vacinas, o que traz a perspectiva de grande avanço ao desenvolvimento tecnológico do país que normalmente utiliza vacinas com alto custo, obtidas por contratos de transferência de tecnologias estrangeiras para suprir o Programa Nacional de Imunização (PNI) do

Ministério da Saúde.

Em função do grande número de casos de DM causada pelo grupo C atualmente no país, o PNI introduziu uma vacina conjugada produzida por um laboratório multinacional, no calendário nacional de vacinação de crianças menores de 2 anos, em Outubro de 2010. Entretanto, existe uma demanda nacional de 80 milhões de doses para a proteção de milhares de crianças, adolescentes e adultos jovens brasileiros (com idade entre 2 meses e 20 anos), contra a infecção causada pela bactéria. Esta demanda justifica a utilização de vacinas produzidas pelos dois laboratórios, com o objetivo de assegurar o fornecimento contínuo do imunobiológico à população. Desta forma, após a conclusão dos estudos clínicos com a nova vacina conjugada, empregando-se tecnologia desenvolvida no país, Bio-Manguinhos poderá obter o registro para a produção e comercialização da vacina a custos mais baixos.

#### **1.4. Controle de Qualidade de Vacinas Conjugadas**

O processo de conjugação polissacarídeo-proteína não apresenta um rendimento de 100%, como o esperado, havendo assim a presença de polissacarídeo e proteína livres em solução, que não participaram do processo de conjugação. Desta forma, há a necessidade de controle de todos os resíduos envolvidos nas diferentes etapas de produção desta classe de vacinas. A eficiência das etapas de produção pode ser monitorada através de métodos de controle sugeridos pela OMS que determinam a concentração máxima dos componentes livres envolvidos na reação de conjugação - proteína e polissacarídeo. O excesso destes componentes livres pode levar a reações adversas e até mesmo à redução da imunogenicidade do componente vacinal (WHO 2000; WHO 2004).

Para a quantificação de polissacarídeo livre são sugeridos pela OMS métodos físico-químicos, cromatográficos ou imunoenzimáticos. Já para a determinação da quantidade de proteína livre na composição da vacina, a OMS sugere a utilização de métodos devidamente validados, como a cromatografia líquida de alta performance ou a eletroforese capilar. A eletroforese capilar é bastante específica e eficiente, podendo

ser utilizada para ambos os tipos de análise. São descritos na literatura métodos utilizando eletroforese capilar para separação de proteína livre em vacinas conjugadas contra meningococcus e pneumococcus (Lamb et al 2000) e para a separação de polissacarídeos de diferentes grupos de *N. meningitidis* (Lamb et al 2005). A vacina conjugada contra Hib é produzida e utilizada em diversos países e a OMS preconiza níveis máximos de 5% para a proteína livre e de 20% para o polissacarídeo livre (Farmacopéia Européia 2005; Cuervo et al 2007). Entretanto, para a vacina conjugada contra *N. meningitidis* do grupo C, apenas o nível máximo de proteína é sugerido (5%), sendo ainda necessários estudos comparativos entre as vacinas de diferentes fabricantes e sua eficácia com diferentes teores de polissacarídeo livre para estabelecer o seu conteúdo máximo (WHO 2004). Desta maneira, torna-se necessário o desenvolvimento e padronização de técnicas sensíveis que possibilitem o controle dos componentes livres envolvidos no processo de conjugação.

### **1.5. Métodos para separação e detecção de componentes livres em vacinas conjugadas**

Os métodos físico-químicos e cromatográficos são mais constantemente empregados na área de produção de vacinas, por serem eficazes no controle de qualidade das diferentes etapas de produção e purificação. Para o emprego destes métodos na separação do açúcar e proteína livre é necessário que sejam conhecidas as características das moléculas envolvidas no processo como: tamanho, carga e estabilidade. Através das diferenças encontradas entre as moléculas é possível direcionar o uso, seja de compostos químicos ou de colunas cromatográficas que possibilitem a interação de maneira específica com os compostos envolvidos, promovendo assim a sua separação.

Uma abordagem físico-química foi descrita por Gotschlich et al (1969) e utilizada para a obtenção de polissacarídeos meningocócicos, por ação do detergente catiônico brometo de hexadecil trimetil amônio (Cetavlon), que busca a precipitação dos polissacarídeos, negativamente carregados, sendo ainda hoje amplamente utilizado



como método de purificação de polissacarídeos meningocócicos e de outras espécies (WHO 2004).

Como forma de determinar o teor de açúcar livre em vacinas conjugadas, Lei et al (2000) descreveram um método para separação de polissacarídeo livre em vacinas conjugadas contra *N. meningitidis* utilizando a anatoxina diftérica como proteína carreadora. Estes autores fizeram uma precipitação com o detergente desoxicolato de sódio (DOC), em pH ácido, sob agitação e banho de gelo. A determinação do teor de açúcar livre foi obtida através de ensaios colorimétricos e de cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica. Cuello et al (2006) utilizaram uma reação com anticorpo anti-anatoxina tetânica, visando a separação do componente polissacarídico. Posteriormente, a detecção do açúcar e sua quantificação foram realizadas utilizando cromatografia líquida de exclusão molecular. Em estudos utilizando a vacina contra Hib, Cuervo et al (2007) avaliaram a estabilidade desta vacina conjugada em diferentes temperaturas de estocagem através da mesma técnica empregada por Cuello et al (2006). O parâmetro utilizado para avaliar a estabilidade foi o teor de açúcar livre, mas o grupo não observou um pico referente ao polissacarídeo nos cromatogramas referentes ao conjugado na condição normal de estocagem. Kim et al (2005) mostraram a determinação de polissacarídeo livre em vacina conjugada contra pneumococcus utilizando cromatografia gasosa.

### **1.5.1. Eletroforese Capilar (EC)**

A técnica de eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico (Bier 1959). Historicamente, foi introduzida por Tiselius, na década de 30 para a separação de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo (Tiselius 1937). Desde então, a sua aplicação é bastante efetiva no estudo da atividade biológica de moléculas, mas apenas na década de 80, foi introduzida como metodologia analítica de rotina.

A EC é descrita como um método analítico baseado na migração de um analito dissolvido em uma solução de eletrólito dentro de um capilar, sob a influência de

um campo elétrico e de corrente contínua. Esta técnica vem sendo bastante empregada à sua simplicidade instrumental, à variedade de modos de separação utilizando a mesma coluna capilar e à diversidade de compostos passíveis de serem analisados (Tavares 1996). A Figura 2 mostra o esquema da instrumentação da EC.

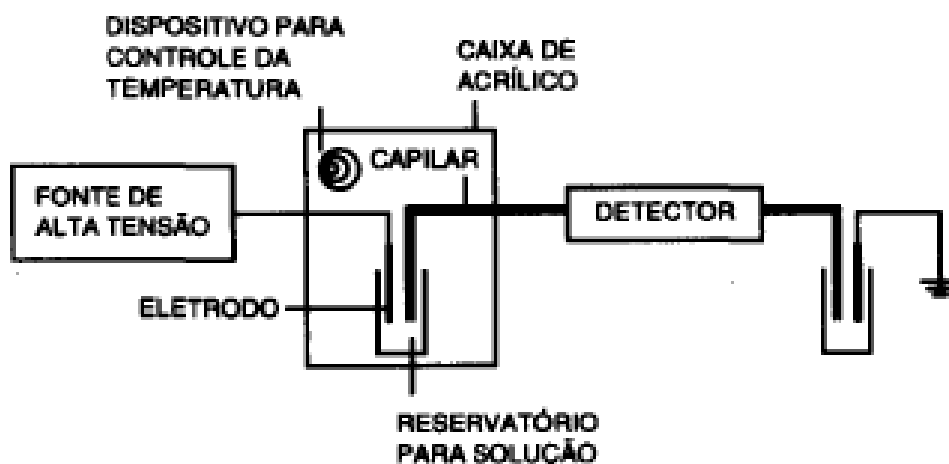


Figura 5 - Esquema de instrumentação para EC (Tavares 1996).

Na EC os capilares são preenchidos com um eletrólito condutor e submetidos à ação de um campo elétrico. O uso de capilares apresenta vantagens sobre os métodos de eletroforese tradicionais por permitir a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica. Além disso, como o capilar apresenta alta resistência elétrica é possível estabelecer campos elétricos mais intensos, o que resulta em uma separação com maior eficiência, alta resolução e curtos tempos de análise (Tavares 1997; Kannamkumarath 2002).

Outras vantagens existentes sobre os métodos de eletroforese tradicionais são a utilização de volumes bastante reduzidos, da ordem de nanolitros e a completa automação da análise. Existe ainda uma compatibilidade com uma variedade de sistemas de detectores disponíveis para cromatografia líquida, como absorção no ultravioleta, fluorescência, espectrometria de massas, entre outros.

Na EC é possível utilizar diversos modos de separação, cada um sendo mais adequado a cada tipo de amostra, são eles: eletroforese capilar de zona (CZE),

cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoelétrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e eletrocromatografia capilar (CEC). As metodologias descritas para a análise de proteína livre em vacinas conjugadas, devido às características das proteínas carreadoras, são a CZE e a MEKC e para as análises de polissacarídeo, utiliza-se apenas a CZE.

#### **1.5.1.1. Fluxo eletrosmótico**

Além da migração eletroforética dos íons, ocorre também a eletrosmose, que consiste no fluxo de solução induzido pelo campo elétrico, o qual confere à técnica características de alta eficiência. O fluxo eletrosmótico é o responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector, o que permite a separação de solutos de cargas positivas, negativas ou neutras. Este fluxo é visto como consequência da aplicação do campo elétrico sobre as paredes do interior do capilar e, controla também, o tempo de permanência dos solutos no capilar através do fluxo e da mobilidade do soluto (Landers 1996).

Dentro do capilar de sílica, o fluxo eletrosmótico ocorre devido aos vários tipos de grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ). Em contato com meio aquoso em pH acima de 7, há a ionização de alguns destes grupos, o que torna a superfície do capilar negativamente carregada pela existência da forma aniônica ( $\text{SiO}^-$ ), devido ao pKa dos grupos silanóis estarem entre 6,5 e 7 (Figura 3). Com a aplicação do campo elétrico as cargas positivas do tampão que interagiram com a parede do capilar são atraídas para o pólo negativo e resultam no estabelecimento do fluxo eletrosmótico responsável pela migração de todos os analitos, independente de sua carga.

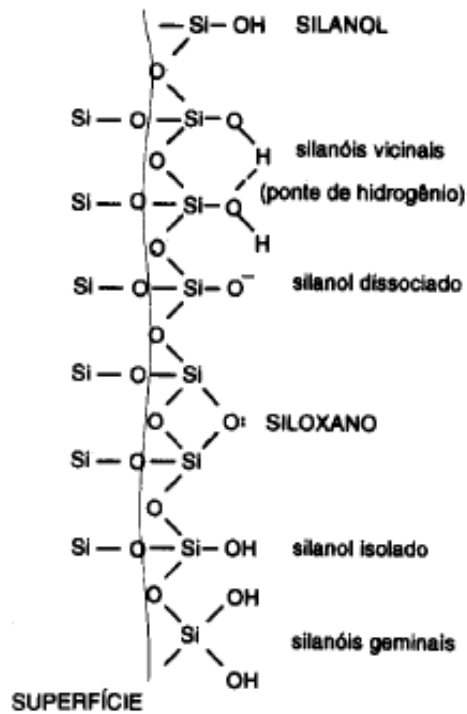


Figura 6 - Representação química esquemática da superfície de um capilar de sílica fundida com formação de grupos carregados negativamente pela ionização de grupos silanol (SiOH).

### 1.5.1.2. Parâmetros Importantes na Separação por EC

#### 1.5.1.2.1. Dimensão do Capilar

Os capilares usados na EC normalmente variam entre 10 e 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo e de 10 a 100 cm de comprimento. A escolha da dimensão do capilar apresenta efeitos no tempo de migração e na resolução da análise, na sensibilidade da detecção e na dissipação de calor. O impacto do aumento do comprimento do capilar ocorre tanto no tempo de migração, que fica maior, quanto no número de pratos teóricos da análise. Variações no diâmetro interno do capilar influenciam no desempenho da separação, já que capilares mais estreitos resultam em maior resolução por dissiparem melhor o calor produzido pela passagem de corrente elétrica (Camilleri 1995).

### **1.5.1.2.2. Temperatura**

Em EC a temperatura é considerada um parâmetro negativo por resultar em perda de eficiência por excessivo aquecimento do capilar. Entretanto, observam-se contribuições relacionadas ao aumento da temperatura do capilar na seletividade da técnica de EC. A temperatura tem relação ainda com a viscosidade do tampão, permitindo análises mais rápidas conforme o aumento deste parâmetro (Camilleri 1995).

### **1.5.1.2.3. pH**

O valor do pH da solução do eletrólito é o parâmetro mais importante em uma separação eletrolítica por influenciar diretamente na seletividade do sistema. Em geral, uma separação eletroforética é baseada nas diferentes mobilidades dos analitos, que dependem da sua carga superficial, do valor do pKa e do pH da solução, da massa e do pl de cada um dos analitos, relacionada com a massa da molécula e do seu grau de hidratação. Desta forma, pequenas variações no pH do eletrólito são responsáveis por grandes impactos no perfil de separação dos analitos (Camilleri 1995).

### **1.5.1.3. Eletroforese Capilar de Zona (CZE)**

A CZE é um dos métodos mais usados na prática devido a sua facilidade de implantação e otimização de condições experimentais. A CZE é a forma mais simples da eletroforese capilar, principalmente porque o capilar é preenchido apenas por um eletrólito com características tamponantes. Além disso, utilizando a CZE é possível a separação de solutos aniônicos e catiônicos através da atuação do fluxo eletroosmótico.

A amostra neste método contém uma mistura iônica e é introduzida no capilar, similar a uma banda de eletroforese tradicional. Influenciada pelo campo elétrico, as espécies iônicas da amostra e do tampão migram para o eletrodo correspondente, catodo ou anodo, de acordo com suas características químicas (Tavares 1996).

#### **1.5.1.4. Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)**

Na eletroforese capilar de zona em solução livre a separação de compostos neutros não é viável, pois estes migram todos com a mesma velocidade do fluxo eletroosmótico, já que não se encontram sobre influência do campo elétrico. Desta maneira, a separação de solutos neutros é feita utilizando a técnica de MEKC, onde a separação do soluto se dá através da distribuição entre as fases aquosa e micelar (Kuhn e Hoffstetter-Kuhn 1993).

A fase micelar é formada pela utilização de agentes tensoativos iônicos em concentrações superiores à concentração micelar crítica, o que proporciona um sistema cromatográfico de duas fases. Neste caso, o eletrólito representa a fase primária a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto as micelas representam a fase secundária a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de compostos neutros é responsável pela seletividade da separação (Lamb et al 2000).

### **1.6. Validação de Métodos Analíticos**

Para a utilização de uma metodologia é fundamental que os laboratórios disponham de critérios para demonstrar que os métodos analíticos utilizados geram resultados adequados e confiáveis às análises pretendidas. A fim de tornar o método de quantificação mais adequado e confiável, consideram-se parâmetros publicados nas Orientações sobre Validação de Métodos Químicos e no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA 2003, INMETRO 2010).

#### **1.6.1. Seletividade**

A matriz pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o pico. Por este motivo é necessário avaliar a seletividade de um método analítico que representa a sua capacidade de

avaliar a substância de interesse na presença de componentes da amostra que poderiam interferir na sua determinação. A seletividade de um método analítico é avaliada quando a resposta obtida para a substância de interesse em presença de todos os componentes da amostra é igual àquela obtida em uma solução que contém somente a substância de interesse. Quando essa homogeneidade não ocorre, diz-se que há efeito da matriz na análise, que pode ser estudado avaliando adições de quantidades conhecidas do analito de interesse à amostra e construindo-se a curva analítica sobre a amostra, ao invés de utilizar somente o solvente (INMETRO 2010).

### **1.6.2. Linearidade**

O estudo de linearidade tem por objetivo determinar a faixa de concentração dentro da qual o método analítico produz uma resposta, para a substância de interesse, linearmente proporcional à concentração presente na amostra. Para a avaliação da linearidade é necessário construir uma relação entre a concentração de analito e às respostas obtidas, no caso da eletroforese capilar, em área, e verificar se a relação entre eles obedece a um modelo linear.

A relação é obtida através da confecção de uma curva analítica construída pela avaliação de concentrações equidistantes de analito e da verificação de suas respostas. A verificação da linearidade necessita do estudo da normalidade dos resíduos da regressão, sua homogeneidade, independência e o ajuste ao modelo linear.

O método mais utilizado para analisar dados, em geral, é o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Assim sendo, o ajuste da equação da curva analítica assume premissas de regressão e modelo. As premissas que determinam a linearidade da faixa são representadas por testes estatísticos que contemplam a avaliação do modelo linear e dos resíduos, de acordo com cada proposta. Assim, para avaliar a linearidade da faixa de trabalho proposta apresentam-se abaixo as premissas e os testes estatísticos utilizados (Souza 2007):

- Normalidade dos resíduos – Teste de Ryan-Joiner.

- Auto correlação dos resíduos - Teste de Durbin-Watson.
- Homogeneidade dos resíduos - Teste de Brown-Forstythe.
- Ajuste e regressão – Análise de Variância (ANOVA) e Teste estatístico de regressão.

#### **1.6.2.1. Efeito Matriz**

A avaliação do efeito matriz proposto por Souza (2007) é a avaliação de substâncias presentes na matriz da amostra que influenciam na análise por adsorver ou interagir (de alguma maneira) com o analito podendo alterar a resposta do detector à concentração da amostra.

O teste de efeito matriz é realizado através da comparação de curvas analíticas efetuadas com o analito na presença da sua matriz de análise e curvas analíticas da substância de interesse diluída somente em solvente (Thompson et al 2002; INMETRO 2010). Para tanto, faz-se necessário a avaliação de linearidade dos dados experimentais obtidos pela confecção das curvas analíticas em solvente e em matriz, determinando todas as premissas do estudo de linearidade antes da avaliação do efeito matriz (Souza 2007).

É aconselhável que, quando possível, as curvas analíticas no solvente e na matriz sejam analisadas paralelamente, com o mínimo intervalo de tempo entre estas análises para que não haja influencia do tempo na resposta analítica do equipamento. A avaliação do efeito matriz leva em consideração a inclinação e a interseção das curvas analíticas comparando estes parâmetros de ambas as curvas através do teste T.

#### **1.6.3. Limite de Detecção (LOD)**

O LOD é a mais baixa concentração do analito que pode ser detectado com algum limite de confiabilidade utilizando o procedimento experimental avaliado. Este parâmetro pode variar em função do tipo de amostra, sendo fundamental assegurar que todas as etapas do processamento do método analítico sejam incluídas na avaliação deste limite. Para a validação de um método analítico é suficiente fornecer uma



indicação do nível em que a detecção do analito possa ser distinguida do ruído da análise (INMETRO 2010).

#### **1.6.4. Limite de Quantificação (LOQ)**

O LOQ é a concentração mais baixa da substância analisada que pode ser quantificada com certa confiabilidade, utilizando o método experimental escolhido. O LOQ pode ser determinado através da curva analítica, normalmente correspondendo à menor concentração da curva, e deve ser testado com amostras independentes para verificar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO 2010).

#### **1.6.5. Precisão**

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos quando uma mesma amostra é analisada diversas vezes pelo método em estudo, sob idênticas condições de teste. A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo ( $S_i$ ) dos resultados obtidos. A precisão é determinada em três diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO 2010).

##### **1.6.5.1. Repetitividade**

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos quando o método em estudo é aplicado diversas vezes sob a mesma amostra homogênea e estável, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo, avaliando a precisão entre os ensaios. As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando os mesmos procedimentos de medição, observador, instrumento, condições e as repetições devem ser feitas no menor espaço de tempo possível.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos de característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões,

material de referência ou adição do analito, ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO 2010).

#### **1.6.5.2. Precisão Intermediária**

A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definido exatamente quais as condições a variar: diferentes analistas, equipamentos e tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

#### **1.6.5.3. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade refere-se aos resultados de estudos colaborativos entre laboratórios e é importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho de seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO 2010).

#### **1.6.5.4. Robustez**

A robustez pode ser descrita como a capacidade de um método ou teste de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em algum de seus parâmetros que podem fazer parte da fase de análise ou anterior a ela. Um método robusto dá uma indicação de confiabilidade durante o seu uso em uma rotina laboratorial ou industrial (Thompson et al 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver métodos sensíveis para separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres presentes na vacina meningocócica C conjugada brasileira contra *N. meningitidis* do grupo C, desenvolvida por Bio-Manguinhos, por eletroforese capilar. Desta forma, pretende-se desenvolver, padronizar e validar o método de escolha, de modo a introduzi-lo como controle de qualidade da vacina estudada.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Estudar condições para a separação dos componentes livres presentes na vacina meningocócica C conjugada brasileira, aplicando diferentes modos de eletroforese capilar;
- Validar a metodologia de quantificação de polissacarídeo;
- Determinar o conteúdo de polissacarídeo livre em diferentes lotes de vacina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Equipamentos

Todos os equipamentos utilizados possuem procedimentos operacionais descritos e são qualificados periodicamente de forma a garantir as boas práticas de laboratório.

- Equipamento de eletroforese capilar HP <sup>3D</sup>CE, com detector de foto diodos dotado de controle de temperatura por ar forçado, eletrodos de platina e “ChemStation Software”, modelo G1601A, para controle do equipamento e tratamento de dados. Detecção no ultravioleta (192 nm).
- Balança analítica, modelo CP225D, com cinco casas decimais, marca Sartorius, Alemanha.
- Sistema de purificação de água, marca Millipore, modelo Milli Academic, EUA.
- Voltímetro acoplado a eletrodo de vidro, marca CORNING, modelo 440, EUA, calibrado diariamente com soluções padrão de pH 4 e 10.
- Agitador mecânico com controle de temperatura, marca IKA, Alemanha, modelo IKA RH-KT/C.
- Banho ultrassônico, marca Branson, modelo 5510R-DTH.

#### 3.2. Materiais utilizados no equipamento

- Frasco em polipropileno com capacidade de 1 mL, Agilent Technologies, EUA.
- Septo em poliuretano para frasco de amostragem para uso em eletroforese capilar, Agilent Technologies, EUA.
- Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, de 48,5 cm de comprimento e

tamanho efetivo de 40 cm x 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, Agilent Technologies, EUA.

- Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, de 64,5 cm de comprimento e tamanho efetivo de 56 cm x 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, Agilent Technologies, EUA.
- Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, de 80,5 cm de comprimento e tamanho efetivo de 72 cm x 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, Agilent Technologies, EUA.
- Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida, de 112,5 cm de comprimento e tamanho efetivo de 104 cm x 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, Agilent Technologies, EUA.

### 3.3. Reagentes

- $\alpha$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina, Acros organics, Código: 227290060 e 227410061.
- Solução 4-hidroxi acetofenona 1 mM, parte integrante do conjunto OQ/PV Standards kit for CE. Agilent Technologies, EUA. Código: 5063-6520.
- Solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Agilent Technologies, EUA. Código: 5062-8575.
- Solução de hidróxido de sódio 1 N. Agilent Technologies, EUA. Código: 5062-8576.
- Tetraborato de sódio (TBNa) ACS, Merck, Alemanha. Código: 1.59344.0040.
- Docecil sulfato de sódio (SDS), Merck, Alemanha. Código: 1.13760.0100.
- Citrato de tri-sódio 2-hidratado, Merck, Alemanha. Código: 11209.

### 3.4. Amostras

#### 3.4.1. Polissacarídeo de *N. meningitidis* do grupo C

O polissacarídeo do grupo C (PSC) foi produzido a partir de cultura da cepa vacinal 2135 de *N. meningitidis*, purificado e controlado de acordo com os procedimentos descritos para produção de vacina meningocócica (Gotschlich et al 1969) e com os Requerimentos da OMS (WHO 1981). Os lotes L-9012 e L-9020 foram produzidos pelo Instituto Finlay, Cuba e o lote 1396 pelo Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB / Bio-Manguinhos).

Posteriormente, os lotes de PSC nativo foram modificados quimicamente, no LATEB / Bio-Manguinhos, antes do processo de conjugação pela reação de oxidação com periodato de sódio (23,4 mM) a 4°C durante 17h, onde ocorreu a introdução de aldeídos terminais e a redução do tamanho da molécula (Jennings e Lugowski 1981). Após a reação de oxidação, o polissacarídeo oxidado (PSC-oxi) foi purificado e concentrado, conforme descrito anteriormente (Jessouron et al 2005; Silveira et al 2007). Os lotes de PSC-oxi foram avaliados quanto à presença de resíduos dos reagentes por diferentes métodos (Silveira 2007), sendo quantificado o teor de ácido siálico pelo método de Svennerholm (1957). Os lotes de PSC-oxi foram utilizados como padrão de polissacarídeo livre e estão apresentados no Quadro 3.

### **3.4.2. Anatoxina Tetânica**

A anatoxina tetânica (TT) foi produzida, destoxificada, purificada e controlada através de procedimentos descritos nos Requerimentos da OMS (WHO 1990), pelo Instituto Butantan, São Paulo/SP. O lote de TT utilizado tem a pureza antigênica igual a 1.666,6 Limite de floculação (Lf)/mg Nitrogênio protéico, que é um valor apropriado para ser utilizado no processo de conjugação do polissacarídeo meningocócico do grupo C, desde que a OMS preconiza um valor superior a 1.500 Lf/ Nitrogênio protéico (WHO 2004).

O TT foi ativado pela introdução de grupos hidrazida através da metodologia da carbodiimida (EDAC), após tratamento com cloridrato de hidrazina à temperatura ambiente e sob condições ácidas (pH 6,1) (Lee e Frasch 2005). A anatoxina tetânica

ativada (TTH) foi purificada pelo processo de diafiltração e concentrada através de filtração tangencial (Jessouron et al 2005; Silveira et al 2007). Lotes de TTH purificados foram avaliados quanto à presença de resíduos de reagentes por diferentes métodos (Silveira 2007), sendo o teor de proteína avaliado de acordo com o método de Lowry et al (1951). As amostras de proteína nativa e ativada estão mostradas no Quadro 3.

### 3.4.3. Conjugados

Os conjugados (PSC-TT) foram obtidos através da ligação covalente entre os aldeídos gerados no polissacarídeo ativado e os grupamentos hidrazida da proteína em presença de cianoborohidreto de sódio, como agente redutor (método derivado da técnica de aminação redutiva descrita por Jennings e Lugowski 1981). Após bloqueio dos grupos funcionais que não reagiram, os conjugados foram purificados pelo processo de diafiltração contra PBS 0,02 M e concentrado por ultrafiltração tangencial (Sistema Centramate – Pall BioPharmaceuticals; Jessouroun et al 2005; Silveira et al 2007). Este método foi aplicado para remoção do componente sacarídico livre e dos reagentes residuais usados no processo de conjugação (WHO 2004; Jódar et al 2004). Os conteúdos de açúcar e de proteína foram avaliados conforme Svernerholm (1957) e Lowry et al (1951). As amostras de conjugado descritas anteriormente estão dispostas segundo suas características principais no Quadro 3.

*Quadro 3* - Amostras utilizadas na análise por eletroforese capilar com separação por lote, concentração de polissacarídeo (PSC), de proteína (TT), de proteína ativada (TTH) e data de obtenção.

Amostra	Lote	Lote PSC-nativo	Conc. de PSC (mg/mL)	Conc. de TT (mg/mL)	Data de obtenção (PSC-TT)
PSC-TT	0110	13/96	0,63	2,85	Janeiro 2010
PSC-TT	0410	L-9012	0,57	2,07	Março 2010
PSC-TT	0510	L-9012	0,47	1,74	Abril 2010
PSC-TT	0111	L-9020	0,57	2,44	Janeiro 2011
TT (IB-PAG)	0509	--	--	14,25	Julho 2009
TTH	0110	---	--	65,00	Janeiro 2010
PSC-oxi	0709	13/96	70,69	--	Dezembro 2009
PSC-oxi	0210	L-9012	48,26	--	Março 2010

### **3.5. Eletroforese Capilar**

Os experimentos de eletroforese capilar foram realizados sob a orientação da Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, no Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Departamento de Química, INCQS – FIOCRUZ.

A utilização da técnica de eletroforese capilar está de acordo com Lamb et al (2000, 2005), que descreveram o emprego da técnica de MEKC para a determinação da proteína carreadora livre em vacinas conjugadas e para a separação de diferentes tipos de polissacarídeos meningocócicos. Para esta avaliação as amostras utilizadas não necessitam de tratamento prévio, sendo introduzidas no sistema no mesmo tampão em que foram produzidas. Para as análises dos componentes descritos foi necessário que o teor de açúcar estivesse entre 0,5 e 1 mg/mL e o de proteína entre 1 e 3 mg/mL (Lamb et al 2000).

#### **3.5.1. Procedimentos Gerais**

##### **3.5.1.1. Tratamento inicial dos capilares**

O capilar virgem foi condicionado com um fluxo de NaOH 1 M por dez minutos, espera de cinco minutos, água por dez minutos e eletrólito de corrida por trinta minutos.

##### **3.5.1.2. Condicionamento dos capilares**

1. Pré-condicionamento: Entre as análises, foram introduzidos nos capilares, eletrólito de corrida com variação de tempo de 1 a 10 minutos.
2. Pós-condicionamento: Foi realizada introdução de NaOH 0,1 M e água nos capilares no intervalo de tempo de 1 a 10 minutos de cada substância.



### 3.5.2. Análise de Proteína Livre

Inicialmente, fez-se o estudo de modos de eletroforese capilar que se aplicassem à separação de macromoléculas, como as proteínas, tendo como princípio as relações de carga e massa das moléculas presentes no conteúdo vacinal. Por este motivo, optou-se por utilizar CZE e MEKC na separação da TT livre presente na vacina meningocócica C conjugada brasileira (Lamb et al 2000).

#### 3.5.2.1. Estudo do modo de CZE

As análises por CZE para a separação da proteína livre foram realizadas variando os seguintes parâmetros (cada condição foi testada três vezes para verificar a sua influência sobre a análise):

- **Temperatura:** foram estudadas análises na faixa de temperatura de 20°C a 60°C, com variações de 5°C;
- **Tensão:** testou-se variações de tensão de 10 a 30 kV e também foram realizados gradientes de tensão de 15 a 30 kV a fim de melhorar os perfis das análises;
- **Comprimento do capilar:** utilizou-se capilares de comprimento efetivo de 56 e 72 cm, para que pudessem ser utilizados diferentes tipos de tampões;
- **Composição e concentração de tampão:** foram utilizados nas análises eletrólitos para preenchimento dos capilares contendo tampão tetraborato de sódio (TBNa) nas concentrações de 10 a 250 mM e, também, tampão citrato nas concentrações de 10 a 50 mM, quando as corridas foram realizadas em condições ácidas;
- **pH:** variou-se os valores deste parâmetro de 4 a 6 e de 8 a 11;
- **Introdução da amostra:** hidrodinâmica de 30 mbar por 10 segundos.

Após variar estas condições de análise, tentou-se a introdução do tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), a fim de modificar as características da análise, o que alterou o modo de separação para MEKC.

### **3.5.2.2. Estudo do modo de MEKC**

Para a técnica de MEKC foi utilizado o SDS como tensoativo cujo valor de concentração micelar mínima (CMC) é de 8,7 mM. Desta forma, soluções que apresentam concentração de SDS superior à CMC são capazes de formar micelas.

#### **3.5.2.2.1. Preparo do Tampão**

Para realização da MEKC foi utilizado um volume de 15 mL de uma concentração constante de tampão TBNa 50 mM, acrescido de 2,5 mL de diferentes concentrações de SDS (200 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM e 10 mM) e 2,5 mL de água desionizada, sendo a faixa de pH utilizado de 9,15 - 9,25. O tampão foi preparado no dia de utilização e a concentração variável de SDS visava encontrar a concentração ótima que permitisse a observação de um eletroferograma com pouco ruído e alta resolução, onde os componentes vacinais estivessem devidamente separados.

A fim de melhorar as condições de análise foi utilizado também o acréscimo de ciclodextrinas (CD) alpha ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) ao tampão nas concentrações de 1 mM e 5 mM visando otimizar a separação, através de sua possível complexação com alguma das moléculas estudadas (Saltão e Veiga 2001).

#### **3.5.2.2.2. Preparo da Amostra**

O conjugado PSC-TT 0110 utilizado para estas análises não necessitou de preparo prévio.

Para os ensaios que utilizaram a proteína, seja ela ativada ou nativa foi feita a diluição para a concentração de 2 mg/mL, de acordo com Lamb et al (2000). Nos ensaios de fortificação as amostras foram preparadas com 250 mL de conjugado e 250 mL de proteína na concentração de 2 mg/mL.

#### **3.5.2.2.3. Condições de análise estudadas**

Após encontrar a concentração de SDS que mais favorecia a análise, variou-se a concentração do tampão (50 a 200 mM), a tensão aplicada ao capilar (15 a 30 kV) e a temperatura do cassete (40 a 60°C) a fim de melhorar a resolução de separação.

### 3.5.3. Análise do Polissacarídeo Livre

#### 3.5.3.1. Condições analíticas de eletromigração estudadas no modo CZE

Para separar o polissacarídeo livre presente na amostra do conjugado e assim possibilitar a sua quantificação, foram estudadas variações das seguintes condições (cada condição foi testada três vezes para verificar a sua influência na análise):

- **Temperatura:** foram estudadas variações na faixa de temperatura entre 25° a 60°C, fazendo variações de 5°C;
- **Tensão:** foram testadas variações de tensão de 10 a 30 kV e também foram construídas curvas de tensão a fim de melhorar os perfis das análises;
- **Comprimento do capilar:** os capilares utilizados foram os de comprimento efetivo de 40 e 104 cm, visando avaliar o desempenho das análises;
- **Concentração de tampão:** foram testadas as concentrações de TBNa entre 10 mM e 200 mM;
- **pH:** variou-se os valores deste parâmetro de 8 até 11;
- **Introdução da amostra:** hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos.

#### 3.5.3.2. Preparo do Tampão

A solução de TBNa 50 mM utilizada para análise foi preparada pesando-se 2,0137g de TBNa e diluindo-o com aproximadamente 190 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada utilizando agitador magnético por 5 minutos e foi ajustado o pH para 10 com solução de NaOH 1 M. O volume foi completado para 200 mL após ter alcançado a temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada com membrana de

0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade.

### **3.5.3.3. Preparo das amostras**

Para a utilização dos conjugados não foi necessário nenhum tratamento prévio dos diferentes lotes (Lamb et al 2000).

Para os ensaios envolvendo adição de PSC-oxi na elaboração da curva analítica, o polissacarídeo foi diluído para concentração aproximada de 10 mg/mL e, posteriormente, fez-se o doseamento deste componente, utilizando o método colorimétrico de resorcinol (Svennerholm 1957), onde o ácido siálico, constituinte da cápsula polissacarídica do meningococo do grupo C, apresenta uma coloração característica.

Os diferentes lotes de PSC-oxi utilizados foram diluídos em água até as concentrações pretendidas, para a confecção da curva analítica em solvente. Para a análise do efeito matriz o PSC-oxi foi diluído nas mesmas concentrações, porém usando a amostra de conjugado PSC-TT 0510, como solvente.

Nos ensaios de fortificação foi utilizado o acréscimo de polissacarídeo a fim de obter a concentração de 0,094 mg/mL, equivalente a 20% de polissacarídeo livre.

### **3.5.3.4. Cálculos dos pontos da curva analítica (desenho experimental)**

A maior parte das referências relacionadas à validação interlaboratorial direcionam a determinação do desenho experimental com um mínimo de seis níveis de concentração para confecção da curva analítica utilizando-se duas a três replicatas independentes de cada nível. É aconselhado que para preparar as soluções de trabalho, três soluções genuínas e concentradas sejam diluídas sucessivamente para as concentrações desejadas (Thompson et al 2002). Neste trabalho foram realizadas as análises a partir de duas soluções genuínas de PSC-oxi.

As concentrações de PSC-oxi utilizadas na curva analítica foram calculadas a partir do teor máximo de polissacarídeo livre preconizado pela OMS (C) para a

primeira vacina conjugada contra Hib, que é em torno de 20% (Farmacopéia Européia 2005). A partir deste limite, propôs-se 7 concentrações equidistantes (Quadro 4) feitas a partir de duas soluções genuínas, a fim de determinar se estas concentrações constituem um modelo linear.

Quadro 4 - Concentrações equidistantes utilizadas para a confecção da curva analítica e avaliação da faixa linear.

Percentual de PSC-oxi	Concentrações dos pontos da curva analítica (mg/mL)
1(5%)	0,0235
2 (10%)	0,0470
3 (15%)	0,0705
4 (20%)	0,0940
5 (25%)	0,1175
6 (30%)	0,1410
7 (35%)	0,1645

### 3.5.3.5. Teste de Linearidade

Para verificar se as concentrações satisfaziam ao modelo linear foi necessário primeiramente retirar os valores aberrantes da análise, no máximo 2 valores, que correspondem a aproximadamente 22%, por se tratar de um conjunto de 14 dados, utilizando o método dos resíduos padronizados Jackknife (Horwitz 1995).

Posteriormente foi realizada a avaliação dos resíduos da regressão, através do MMQO que parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade por Ryan e Joiner (1976); homogeneidade por Levene (1960) e Brown e Forsythe (1974); e independência dos resíduos de regressão por Durbin e Watson (1951). O teste F foi

conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (Draper e Smith 1998).

#### **3.5.3.6. Avaliação do Efeito Matriz**

Para avaliar a possível interferência da matriz na quantificação do polissacarídeo, foi necessário realizar a curva analítica usando como solvente ao invés de água, a matriz, ou seja, a amostra do conjugado vacinal. Para isso, utilizou-se a adição das mesmas concentrações já testadas anteriormente no teste de linearidade e fez-se a análise do polissacarídeo dissolvido na matriz. As áreas de cada nível de concentração na matriz foram subtraídas da área média do conjugado PSC-TT 0510 para a obtenção da resposta relativa às soluções de adição. Os dados experimentais obtidos para as curvas do analito no solvente e na matriz foram analisados pelo MMQO e pelas premissas descritas no item anterior.

Posteriormente, realizou-se a verificação da homogeneidade entre as análises no solvente e na matriz e o teste T para avaliar se havia similaridade entre as curvas, sugerindo ou não o efeito da matriz na quantificação da amostra (Ribani et al 2004).

A determinação de LOD e LOQ foi realizada após a avaliação da curva analítica mais adequada através das equações sugeridas por Souza (2007).

#### **3.5.3.7. Repetitividade**

A análise de repetitividade foi realizada introduzindo-se a amostra de conjugado PSC-TT 0510 e avaliou-se o tempo de retenção tanto do conjugado como do PSC-oxi livre, além da área referente ao polissacarídeo. As análises foram feitas através de 12 repetições a partir de 3 tubos diferentes (4 introduções por tubo). A avaliação da repetitividade foi feita calculando-se as características de aceitabilidade de precisão de um método, através da equação de Horwitz e do uso dos valores de HORRAT (Equação 1 e 2). Para que a repetitividade seja aceitável o valor de HORRAT deve ser menor ou igual a 2.

$$PRSD = 2 \times C^{-0,1505}$$

Equação 1

$$HORRAT = \frac{CV_{repe}(\%)}{\frac{2}{3} PRSD_R}$$

Equação 2

Sendo:

*PRSD<sub>R</sub>* = Desvio padrão relativo*C* = teor máximo de polissacarídeo livre preconizado pela OMS*CV<sub>repe</sub>* (%) = Coeficiente de Variação de Horwitz

### 3.5.3.8. Precisão intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi realizada variando-se o dia de análise e o analista, a fim de verificar como estas mudanças poderiam interferir nas análises na rotina laboratorial. Através da avaliação do desvio padrão de precisão intermediária (Equação 3) para cada nível de concentração, foi possível identificar em qual faixa obtém-se a maior precisão entre as análises. Para isso, foram realizados dois preparos de amostras por dois analistas em dois dias de análise. Foram feitas as sete concentrações já descritas dissolvidas na matriz em duplicata. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com a orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO 2010), utilizando-se a fórmula:

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2 \cdot t} \cdot \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Equação 3

Sendo:

*t = total de amostras ensaiadas;*

*j = número da amostra;*

*k = número do ensaio da amostra;*

*y<sub>j1</sub> = primeiro resultado obtido para a amostra j;*

*y<sub>j2</sub> = segundo resultado obtido para a amostra j;*

### **3.5.3.9. Robustez**

A robustez do método eletroforético foi determinada por análises das amostras sob diferentes condições. Foram feitas três repetições por cada mudança de condição, variando-se o pH (9,5 – 10,0 – 10,5) e a temperatura (35°C - 40°C - 45°C). Os efeitos nos parâmetros tempo de retenção e área do pico referentes à concentração de polissacarídeo livre foram analisados. O efeito das variações descritas sobre o método foi analisado por comparações múltiplas utilizando testes estatísticos.

### **3.5.4. Quantificação de Lotes**

#### **3.5.4.1. Construção da Curva de Adição Padrão**

Para realizar a quantificação de açúcar livre presente nos lotes de conjugado foi necessário construir uma curva utilizando o conjugado do lote específico, como solvente. Posteriormente, diferentes quantidades de PSC-oxi foram adicionadas até as concentrações descritas no Quadro 4 e as amostras foram então analisadas. Os resultados obtidos foram tratados para retirada de valores aberrantes (no máximo dois) e foi construída uma curva de adição correspondente à análise.

Para determinar a concentração de polissacarídeo livre presente na amostra de cada lote de conjugado, foi necessário construir uma curva diferente de adição padrão. Por ter sido feita a curva de adição utilizando a amostra, a reta de regressão resultante,  $y = bx + a$ , não atingia o eixo x, sendo necessário extrapolar a curva igualando-se o valor de y a zero na equação da reta. Desta forma, foi possível determinar o valor de x,



em módulo (ou seja, independente do sinal), equivalente a  $x = \left| \frac{a}{b} \right|$ . Este valor representa a concentração do polissacarídeo no lote estudado.

#### **3.5.4.2. Lotes Quantificados**

De acordo com o método descrito e validado fez-se a quantificação de 3 lotes de vacina conjugada: PSC-TT 0410, PSC-TT 0510 e PSC-TT 0111, a fim de avaliar, preliminarmente, as variações existentes nos diferentes lotes de vacina conjugada. O lote PSC-TT 0111 foi testado imediatamente após às etapas de produção e purificação e 30, 60 e 90 dias após estocagem a 4°C, para avaliação de uma possível interferência do período de estocagem no conteúdo de polissacarídeo livre.

#### **3.5.5. Análises estatísticas**

Para a verificação da robustez e da diferença presente na quantificação dos lotes em diferentes tempos de estocagem foi realizada Análise de Variância (ANOVA) “one way”, seguida pelo teste “Least Significant Difference” (LSD). O software Statgraphics Plus Version 4.1 (USA) foi utilizado neste cálculo estatístico. Os testes estatísticos utilizaram um intervalo de confiança de 95% e o limite para significância estatística foi determinado para  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Condicionamento do capilar

Os capilares foram condicionados com o mesmo eletrólito usado na corrida e as lavagens foram feitas utilizando fluxo de NaOH 0,1 M e água, para garantir a retirada de possíveis resíduos da análise. O tempo de lavagem e condicionamento foram otimizados de maneira a utilizar o menor tempo possível capaz de fornecer uma lavagem eficaz. O tempo ótimo de lavagem entre as corridas foi de 6 minutos sendo: 1 minuto de NaOH 0,1 M, 2 minutos de água e 3 minutos de tampão de corrida.

### 4.2. Análise da proteína livre

Inicialmente, estudou-se o modo de MEKC para a separação da proteína livre do restante do conjugado. No perfil obtido neste modo, de acordo com as condições descritas por Lamb et al (2000), foi detectada a presença de uma grande quantidade de ruídos nas análises e ainda um pico de baixa intensidade, cerca de 5 mAu, como pode ser observado na Figura 7.

Quando se variou a concentração de SDS de 200 mM até 10 mM foi observada a presença de ruídos em todas as análises. Devido ao valor da CMC do SDS ser 8,7 mM não foi possível reduzir mais a concentração para realizar análises neste modo de EC. Foi utilizado então, o acréscimo de CD ( $\alpha$  e  $\beta$ ) nas concentrações de 1 e 5 mM, visando melhorar o perfil de análise e sua resolução (Figura 8). Como não houve melhora da separação com o acréscimo de nenhum tipo de CD no eletrólito em comparação com o perfil observado sem a sua adição (Figura 7), optou-se por realizar as análises

seguintes no modo CZE, ou seja, sem adição de tensoativos SDS e aditivos (CD). Foi observada também a diminuição dos ruídos, provavelmente, devido ao aumento da intensidade do pico e melhor condicionamento da coluna.

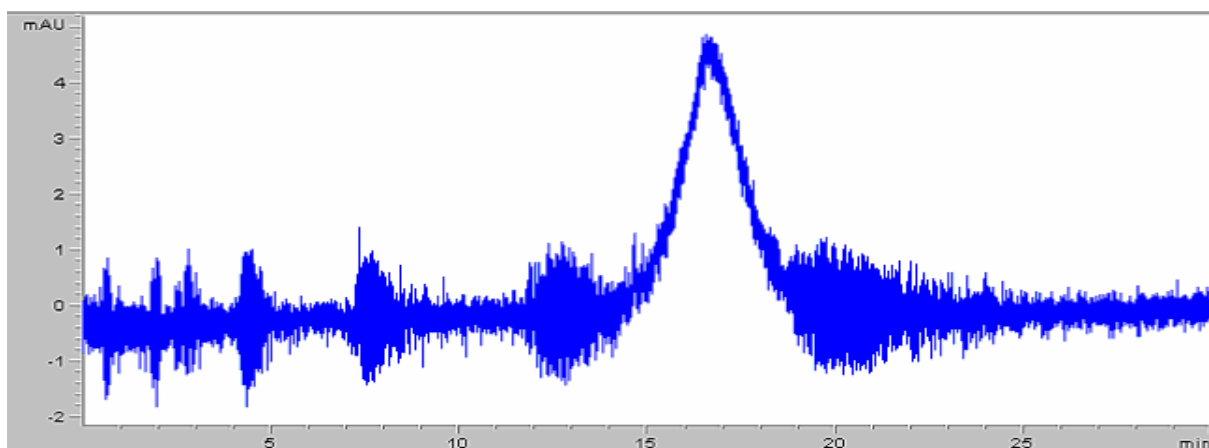


Figura 7 – Eletroferograma da análise do conjugado PSC-TT 0110 por MEKC utilizando como eletrólito Tampão TBNa 50 mM pH 9,2 acrescido de SDS 200 mM, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

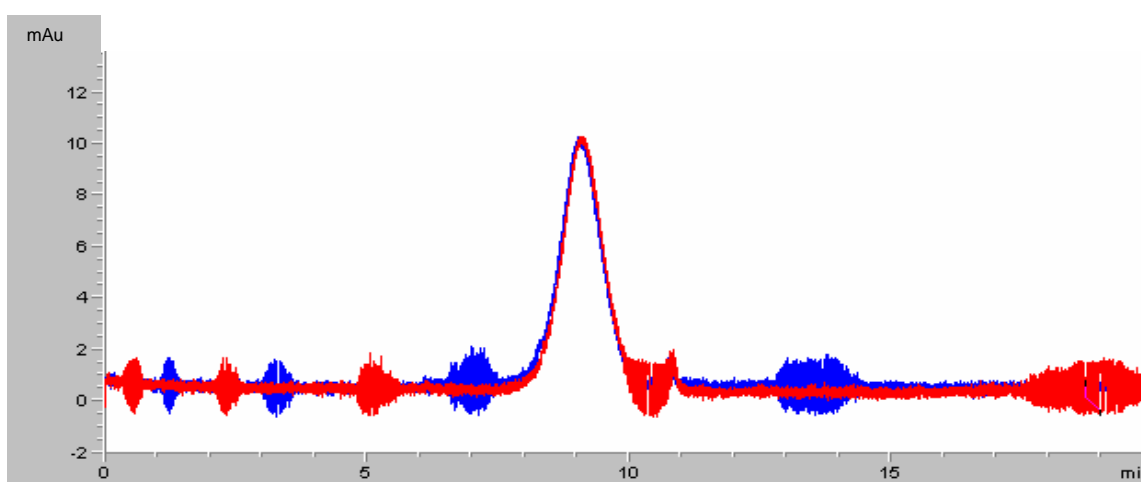


Figura 8 – Eletroferograma referente à introdução da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com acréscimo de CD 1 mM (azul) e 5 mM (vermelho). Condições de introdução: 50 mM TBNa, 10 mM SDS, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

#### 4.2.1. Análises por CZE

No modo CZE foi observada a menor presença de ruídos, mesmo que existentes e a presença de dois picos no eletroferograma presente na Figura 9.

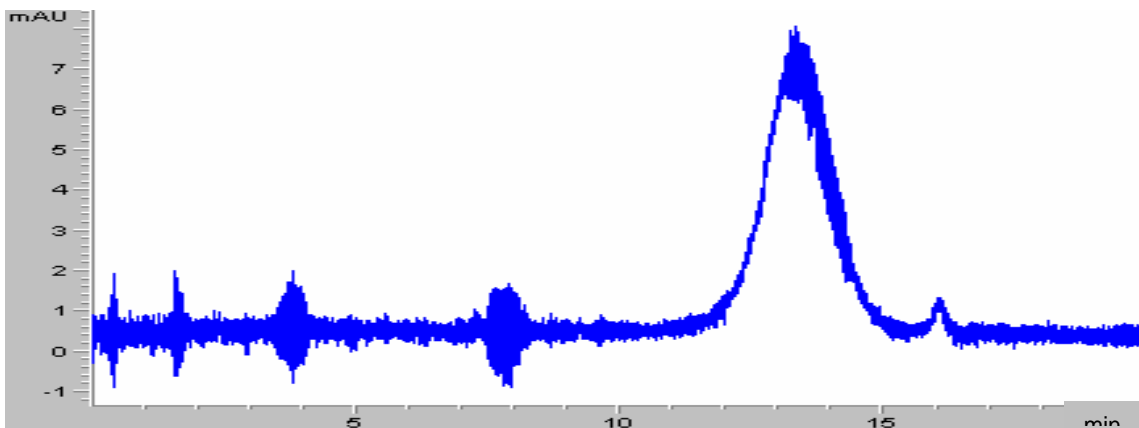


Figura 9 – Eletroferograma referente à análise do conjugado PSC-TT 0110 por CZE nas condições: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 20°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Utilizou-se, inicialmente, tampão TBNa 50mM em pH 9,3 e fez-se a varredura de temperatura de 20 até 45°C e foi verificado que para este tipo de análise a temperatura mais adequada foi de 40°C, já que em temperaturas inferiores ocorreu o aumento nos tempos de migração, e em temperaturas superiores a 45°C ocorreu uma desestabilização da linha de base da análise (Figuras 10a e 10b).

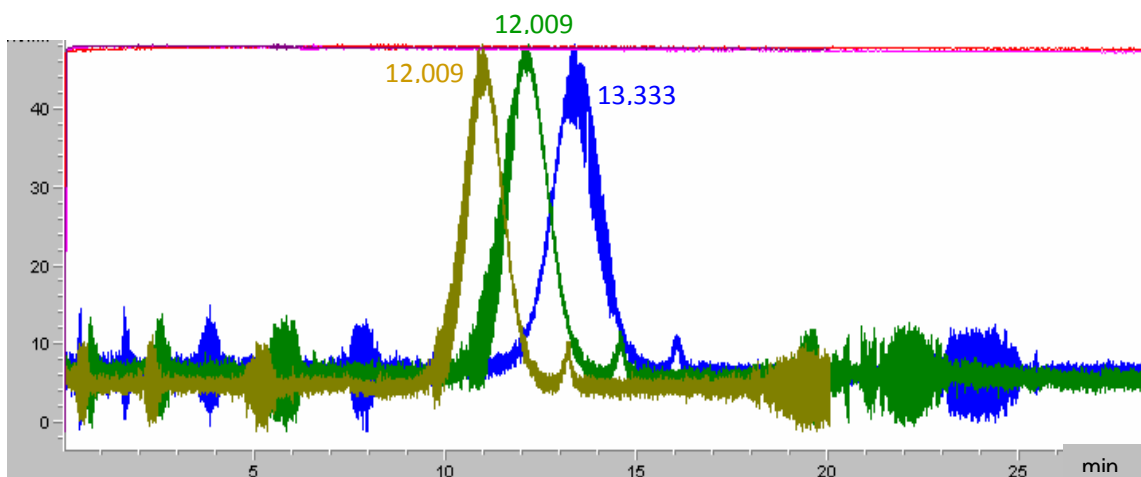


Figura 10a - Eletroferogramas sobrepostos referentes à avaliação da temperatura na análise de conjugado PSC-TT 0110 para a separação da proteína. Condição de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos, temperatura: 20°C (azul), 25°C (verde) e 30°C (marrom). Detecção por UV 192 nm.

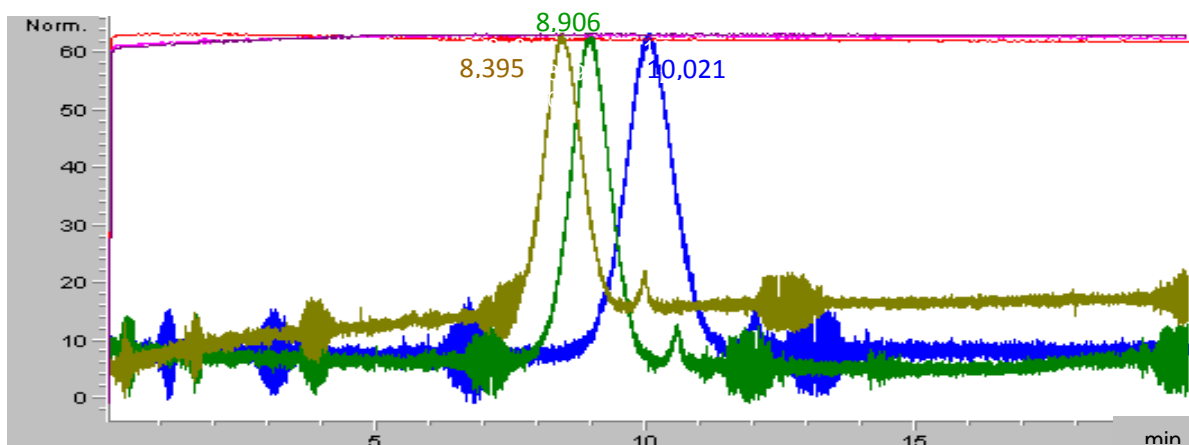


Figura 10b - Eletroferogramas sobrepostos referentes à avaliação da temperatura na análise de conjugado para a separação de proteína. Conjugado PSC-TT 0110. Condição de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos, temperatura: 35°C (azul), 40°C (verde) e 45°C (marrom). Detecção por UV 192 nm.

Posteriormente, variou-se a faixa de pH da análise de 8 até 11. Ao introduzir a TTH e o conjugado, não foi possível observar a separação completa dos componentes utilizando esta faixa de pH, sendo encontrada a melhor resolução de separação em pH 9,3, onde pode-se observar uma região de sobreposição entre os picos (Figura 11). Neste caso, o perfil do conjugado não apresentou região correspondente à proteína.

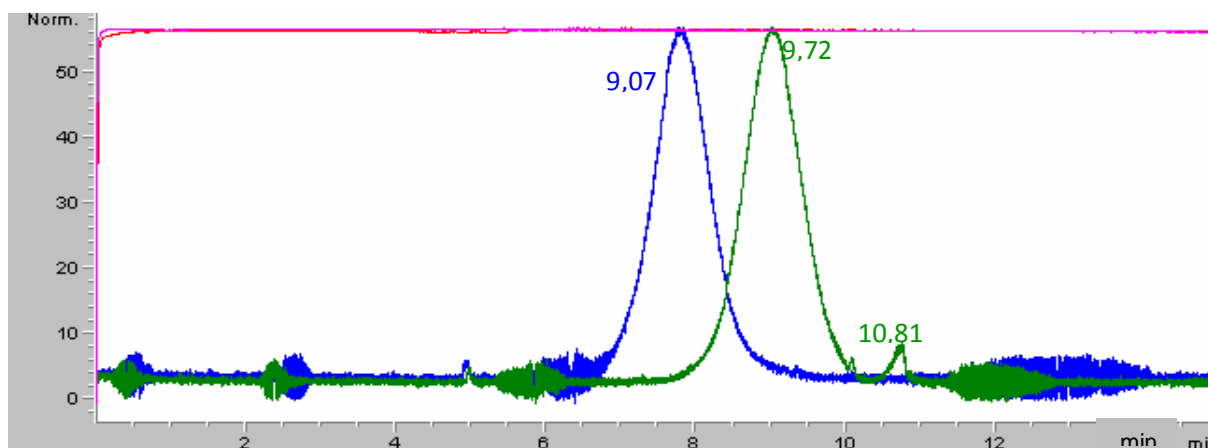


Figura 11 - Eletroferogramas sobrepostos referentes às amostras de TTH 0110 (azul) e conjugado PSC-TT 0110 (verde) utilizando TBNa 50mM pH 9,3, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Com o objetivo de visualizar o perfil da proteína livre no conjugado foram estudados valores de pH mais baixos e por isso, não foi possível utilizar o tampão TBNa. Optou-se pelo tampão citrato de sódio, que possui faixa ótima de trabalho entre o pH 2 e 6. Para a utilização deste tampão foi usada uma coluna nova, de 56 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno, para não haver uma possível influência do primeiro tampão na análise.

Fez-se o estudo de diferentes concentrações de citrato de sódio: 10, 30 e 50 mM (Figura 12). Verificou-se que nestas condições o perfil do conjugado apresentava apenas um pico. Foi observado, utilizando a amostra do conjugado, que o perfil obtido em menor tempo com pico mais estreito e definido foi na concentração de 10 mM (17,006 minutos). Após esta constatação, estudou-se a influência da variação de pH entre 2 e 6 na separação das amostras. Verificou-se que em valores de pH menores que 3,5 ocorria a precipitação da proteína quando esta era diluída em tampão ou em água. Avaliou-se também, as análises em valores de pH 4, 4,5 e 5,2, e foi verificada a inversão da migração dos picos da TTH e do conjugado (Figura 13: A, B e C).

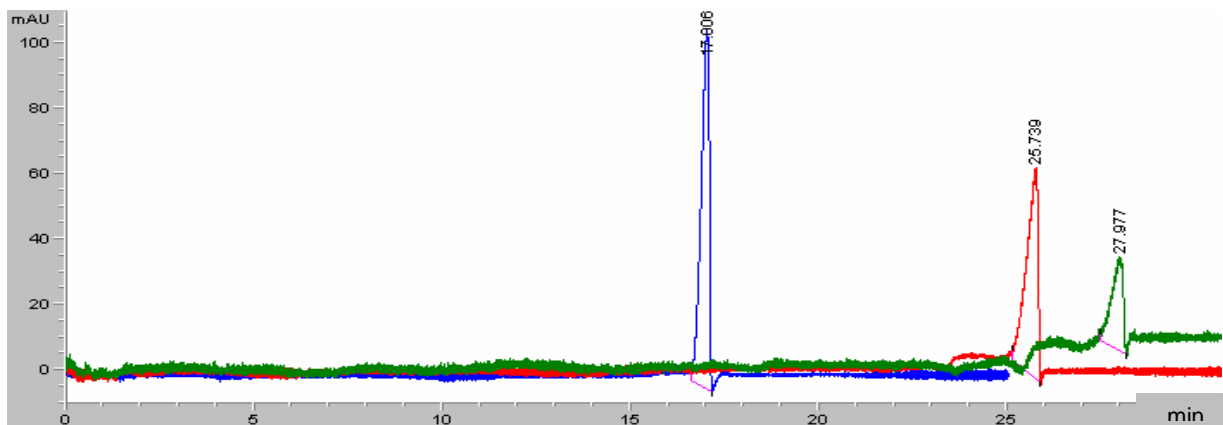


Figura 12 – Eletroferogramas sobrepostos referentes ao conjugado PSC-TT 0110 obtido no estudo de concentrações de tampão citrato em pH 5,2, tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. **Azul:** 10 mM; **Vermelho:** 30 mM; **Verde:** 50 mM. Detecção por UV 192 nm.

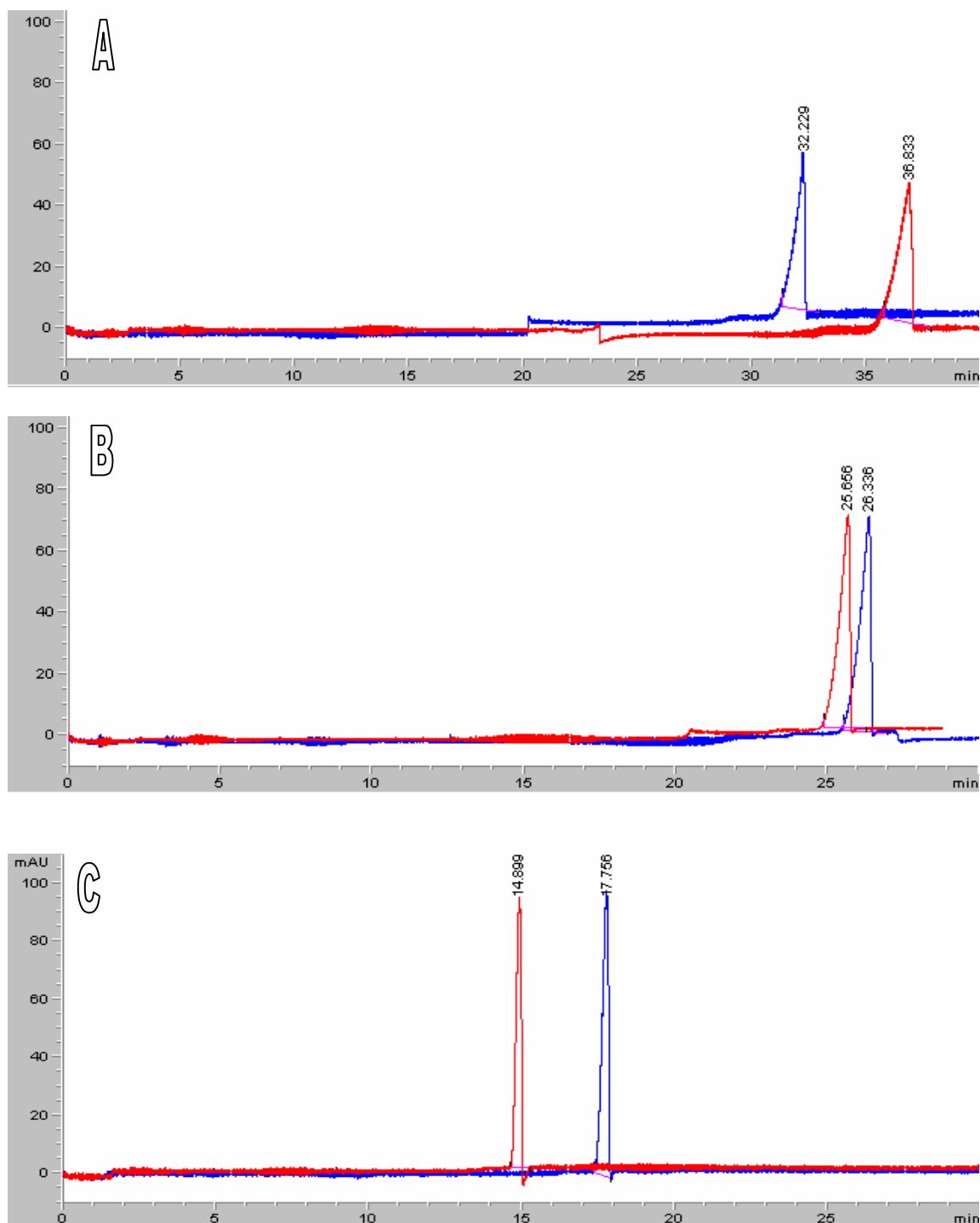


Figura 13 - Eletroferogramas sobrepostos das amostras de conjugado PSC-TT 0110 (azul) e proteína TTH 0110 (vermelho), submetidas à análise em tampão citrato 10 mM com diferentes valores de pH: **A** - pH 4; **B** - pH 4,5; **C** - pH 5,2. Condições de análise: Tensão de 30 kV e temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Observou-se uma alta resolução de separação com os tempos de migração de 14,899 minutos para o TTH e 17,756 minutos para o conjugado, e ainda o melhor perfil dos picos para ambas as amostras na sobreposição dos eletroferogramas em pH 5,2 (Figura 13C). Com o objetivo de avaliar a presença de área referente à proteína livre na amostra de conjugado, estas condições foram utilizadas no ensaio de fortificação do conjugado PSC-TT 0110 com a TTH 0110. Na análise de fortificação, foi observada uma co-migração dos picos com a detecção de um único pico (Figura 14). Em função da possibilidade de haver alguma interação entre as moléculas envolvidas, fez-se a análise da TTH em diversas condições e, ao verificar a condição de TBNa 50 mM pH 9,3, já com a coluna bem condicionada (72 cm de comprimento), verificou-se uma separação da TTH em dois picos com os tempos de migração 5,737 e 7,522 minutos. O segundo pico posteriormente, por semelhança de tempos de migração foi relacionado à anatoxina tetânica em seu estado nativo (7,512 minutos), caracterizando a não ativação de parte da proteína durante a reação de ativação com cloridrato de hidrazina (Figura 15). Desta forma, foi utilizada a espécie nativa como padrão para os ensaios de fortificação seguintes.

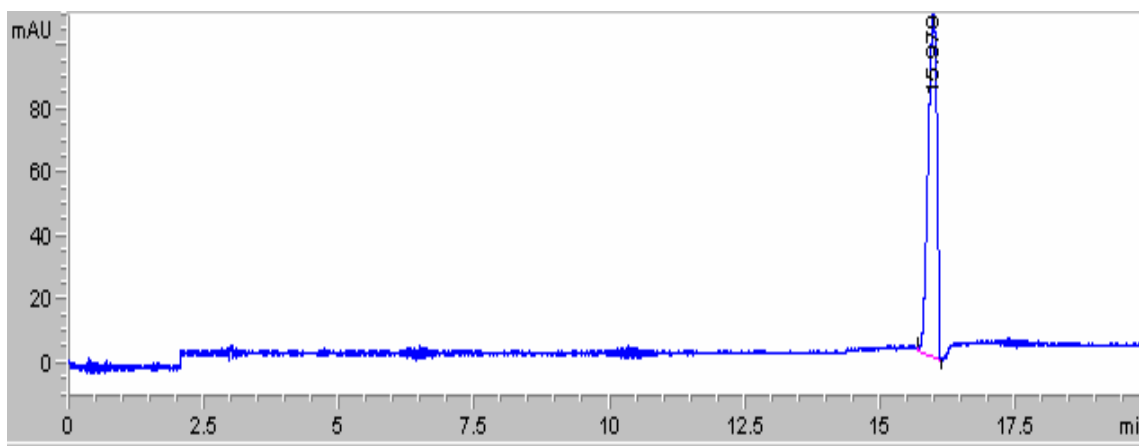


Figura 14 - Eletroferograma da amostra do conjugado PSC-TT 0110 fortificada com TTH 0110 sob as condições de tampão citrato 10 mM, pH 5,2, tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, em coluna de sílica fundida de 56 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.



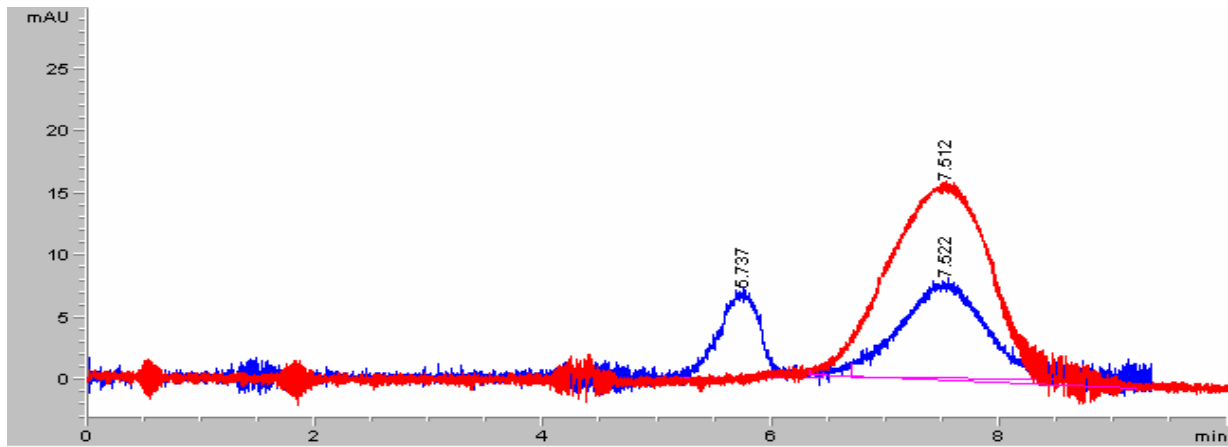


Figura 15 - Eletroferograma contendo a sobreposição dos picos de TTH 0110 (azul) e TT 0509 (vermelho), através da análise em tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, tensão 30 kV, temperatura 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Por ter sido observada uma grande quantidade de proteína nativa na amostra de TTH, optou-se por utilizar esta amostra como padrão para os ensaios. Entretanto, como não foi observada a separação, retornou-se ao modo MEKC, mas desta vez, fez-se a variação de parâmetros ainda não estudados no de Lamb et al (2000).

#### 4.2.2. Análises por MEKC

Primeiramente, estudou-se o tempo de condicionamento da coluna no tampão acrescido de SDS e verificou-se que antes da realização das análises era necessário um condicionamento do capilar de cerca de 30 minutos com eletrólito. Posteriormente, foi observado que concentrações menores de SDS no tampão resultavam em uma redução significativa de ruídos na análise, como pode ser verificado nas diferenças entre os eletroferogramas apresentados nas Figuras 7 e 16.

Desta forma, nas análises iniciais foram avaliadas diferentes concentrações de SDS acrescidas ao tampão TBNa em pH 9,3 e verificou-se que a concentração de 25 mM é a mais adequada para ser utilizada, por induzir um menor tempo de migração das amostras e apresentar uma separação melhor do que àquela observada com 50 mM de SDS (Figura 16). Nestas condições verificou-se o aparecimento de um segundo pico na

amostra do conjugado, diferente do que ocorreu nas análises anteriores, e acredita-se pela carga da molécula se tratar da proteína. Entretanto, foi observada uma separação sem alta resolução entre os dois picos.

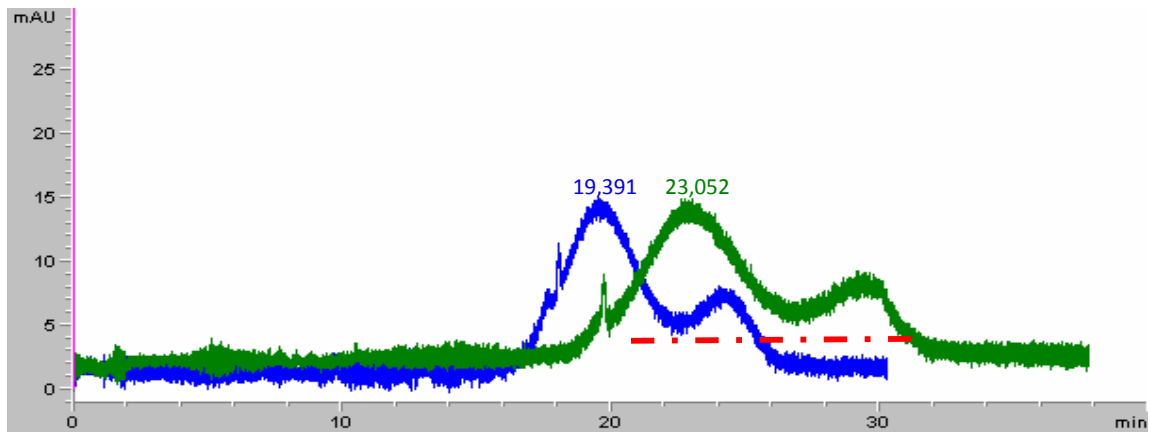


Figura 16 - Estudo da concentração de SDS na separação do conjugado PSC-TT 0110. Azul: 25 mM; Verde: 50 mM. Condições de análise: Tampão TBNa 150mM, 30 kV, pH 9,3, 40°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Observou-se, mantendo a concentração de SDS e variando-se a concentração de TBNa de 50 até 200 mM que a separação foi favorecida pelo aumento da concentração do eletrólito. Deste modo, a separação em que se utilizou 150 mM de TBNa se mostrou mais efetiva, já que nas concentrações abaixo deste valor não era possível observar separação entre o conjugado e o TT e na concentração de 200 mM, houve aumento do tempo de análise, sem que houvesse favorecimento da separação (Figura 17).

Ao avaliar a influência da temperatura de 40 a 60°C na separação da proteína livre do conjugado, foi observado que temperaturas mais elevadas melhoraram a resolução de separação dos picos sendo a temperatura de 60°C a que se mostrou melhor para realização da análise, já que a maior diferença entre as migrações dos dois picos, 6,014 minutos, foi verificada nesta temperatura (Figura 18).

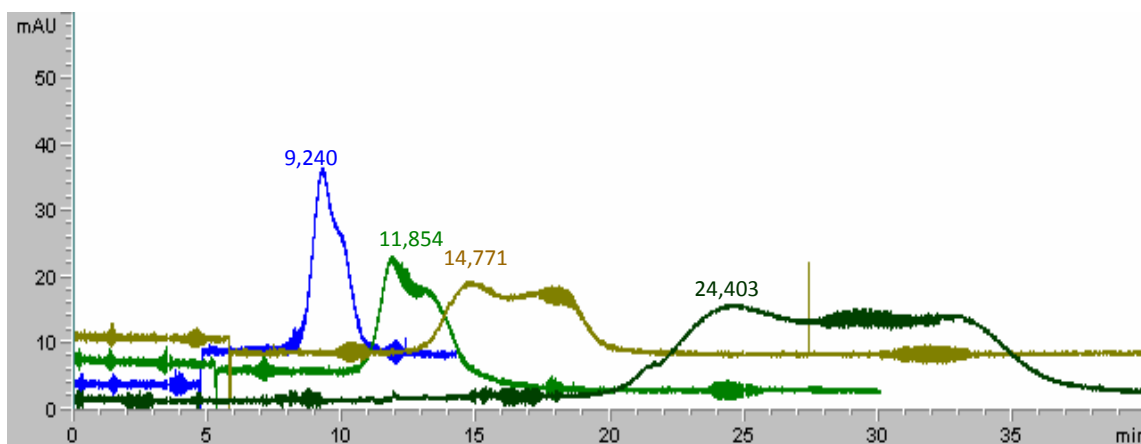


Figura 17 – Eletroferogramas sobrepostos referentes ao estudo das concentrações do tampão TBNa pH 9,3 para a separação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 fortificada com TT 0509: **Azul:** 50 mM; **Verde:** 100 mM; **Marron:** 150 mM.; **Verde escuro:** 200 mM. Condições de análise: tensão de 30 kV, temperatura de 40°C, acréscimo de SDS 25 mM. Análise em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Mesmo empregando-se as melhores condições estudadas para a separação da proteína livre do conjugado, ou seja, tampão TBNa 150 mM, SDS 25 mM, pH 9,3, tensão de 30kV e temperatura de 60°C, não foi observada uma separação completa das duas moléculas (Figura 19).

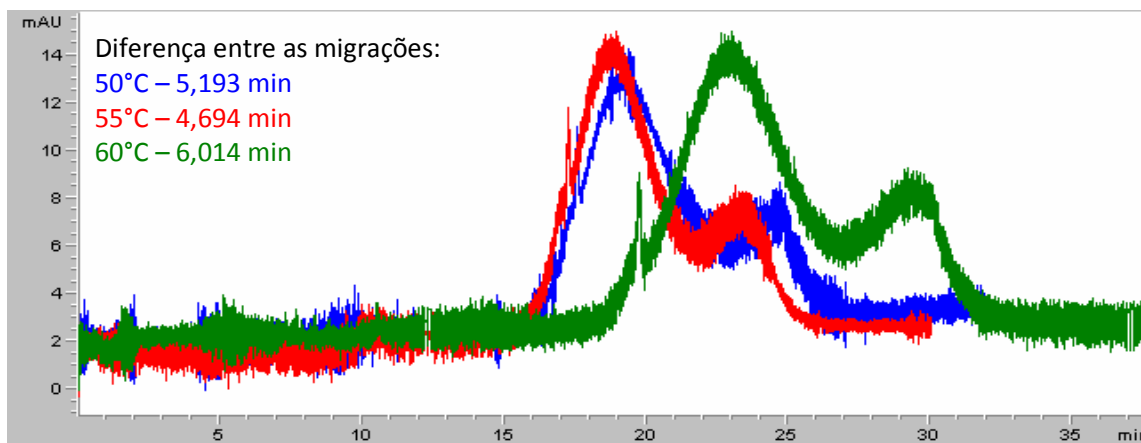


Figura 18 – Eletroferogramas sobrepostos referentes à variação da temperatura da coluna na separação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 utilizando o tampão TBNa 150mM, SDS 25 mM, pH 9,3, tensão 30 kV, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. **Azul:** 50°C; **Vermelho:** 55°C; **Verde:** 60°C. Detecção por UV 192 nm.

Entretanto, foi possível verificar que o segundo pico observado quando se introduziu o conjugado possuía um tempo de migração semelhante ao apresentado pela TT e quando foi realizada a análise do conjugado fortificado verificou-se um aumento de área na região correspondente à proteína nativa (Figura 20).

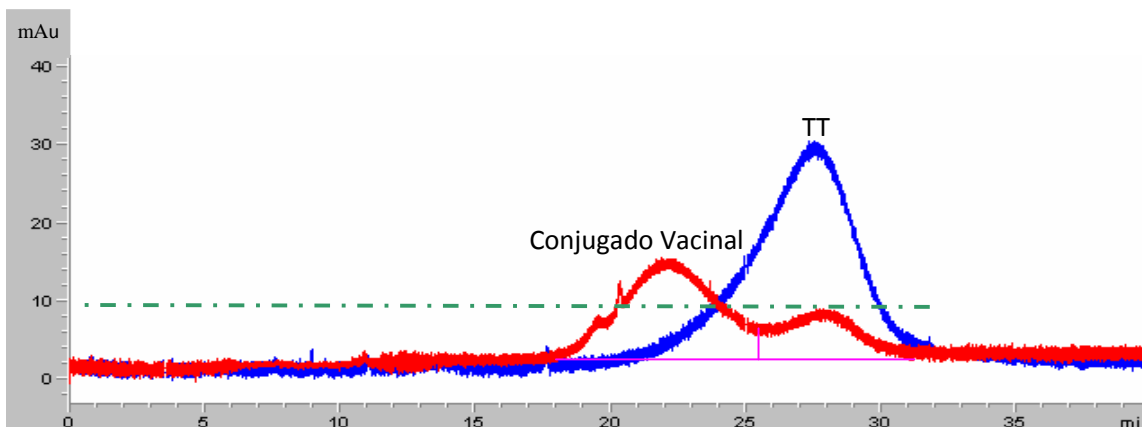


Figura 19 - Eletroferograma referente à sobreposição da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com a TT, nas condições obtidas de análise: TBNa 150 mM acrescido de SDS 25 mM, pH 9,3, tensão de 30 kV, temperatura de 60°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

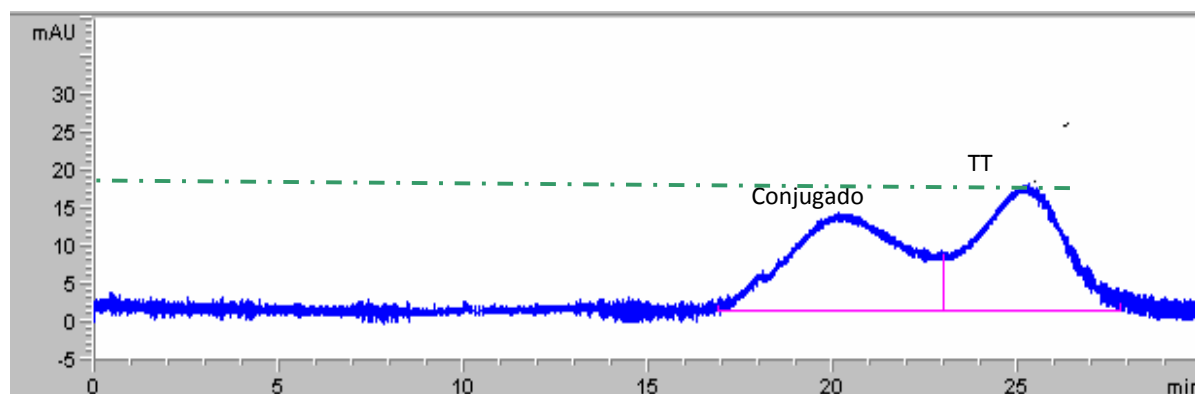


Figura 20 - Eletroferograma referente à fortificação da amostra de conjugado PSC-TT 0110 com a TT, nas condições obtidas de análise: TBNa 150 mM acrescido de SDS 25 mM, pH 9,3, tensão de 30 kV, temperatura de 60°C, em coluna de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

### 4.3. Análise do Polissacarídeo

#### 4.3.1. Separação do Polissacarídeo Livre

As análises para a separação do PSC livre na amostra de conjugado foram realizadas utilizando modo CZE. Para as análises foram utilizadas diferentes concentrações de tampão TBNa, valores de pH e comprimento de colunas.

As análises do PSC foram realizadas utilizando-se, inicialmente, uma coluna de 104 cm. Observou-se, neste caso, a presença de um segundo pico no eletroferograma. Avaliou-se a influência de diferentes valores de pH sobre a separação dos dois picos e foi observado que em pH 10,0, obtinha-se uma melhor resolução de separação sendo observado o retorno à linha de base antes do segundo pico (Figura 21). As diferenças observadas entre os tempos de migração dos dois picos mais relevantes nos eletroferogramas em pH 9,5, 10,0, e 10,5 foram, respectivamente, 3,172; 3,414 e 3,181 minutos (Figura 21).

Nos estudos realizados com as condições ótimas de pH e de concentração do eletrólito foi possível observar dois picos nos eletroferogramas. O primeiro pico com tempo de migração referente ao conjugado e o segundo, possivelmente referente ao PSC livre, com tempos de migração, respectivamente iguais a 20,112 e 23,526 minutos (Figura 21).

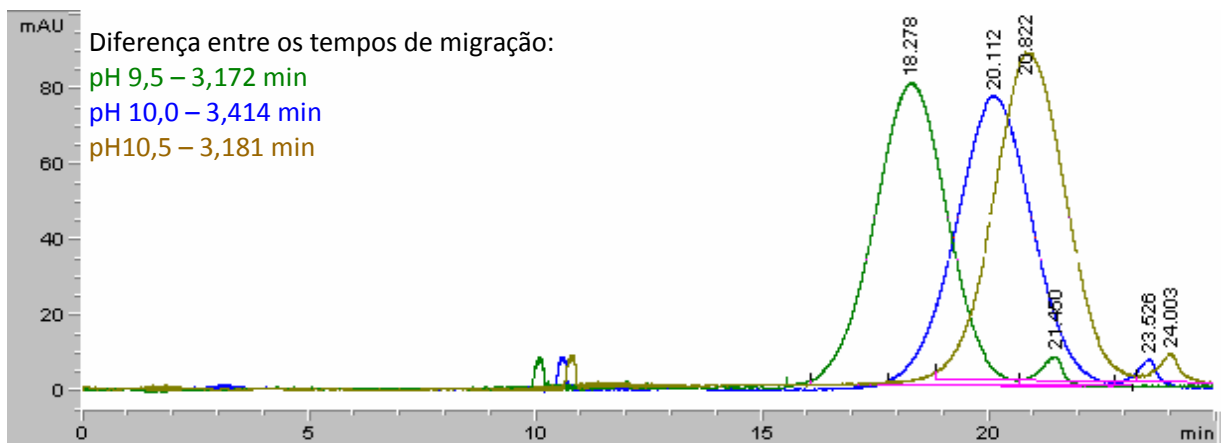


Figura 21 – Estudo da influência do pH na separação do conjugado PSC-TT 0510. Marrom: pH 9,5; Azul: pH 10; Verde pH 10,5. Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Posteriormente, foi possível inferir se tratar do polissacarídeo livre por semelhança nos tempos de migração do PSC-oxi (Figura 23) e por fortificação (Figura 24) utilizando este polissacarídeo como padrão. Desta forma, foi possível observar o

acréscimo de área do segundo pico de 273,676 para 315,881 quando realizada a fortificação (Figura 24).

Realizadas as etapas de separação completa e identificação, foi iniciada a preparação para a quantificação do conteúdo de PSC livre presente no lote de conjugado analisado. Utilizou-se para este ensaio o conjugado PSC-TT 0510 e o PSC-oxi 0210.

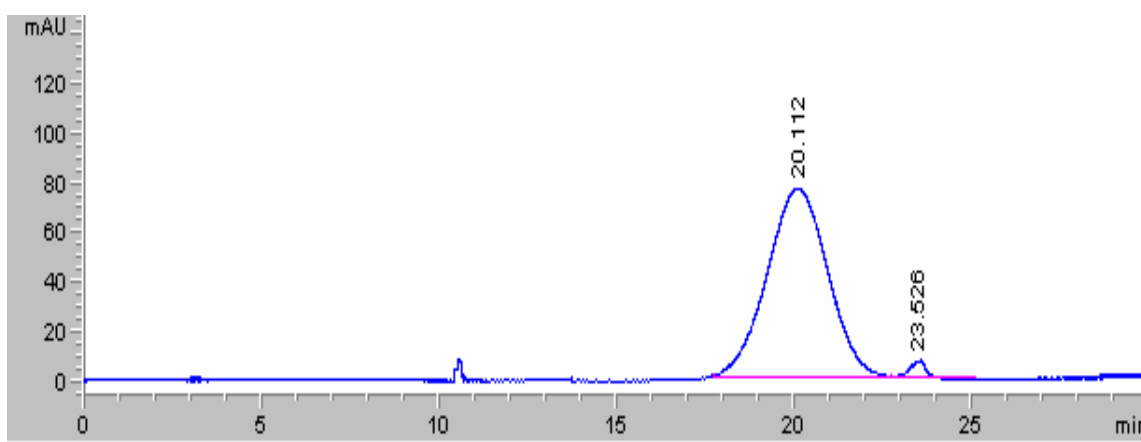


Figura 22 – Eletroferograma referente a amostra de conjugado PSC-TT 0510 no pH ótimo de análise. Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos. Detecção por UV 192 nm.

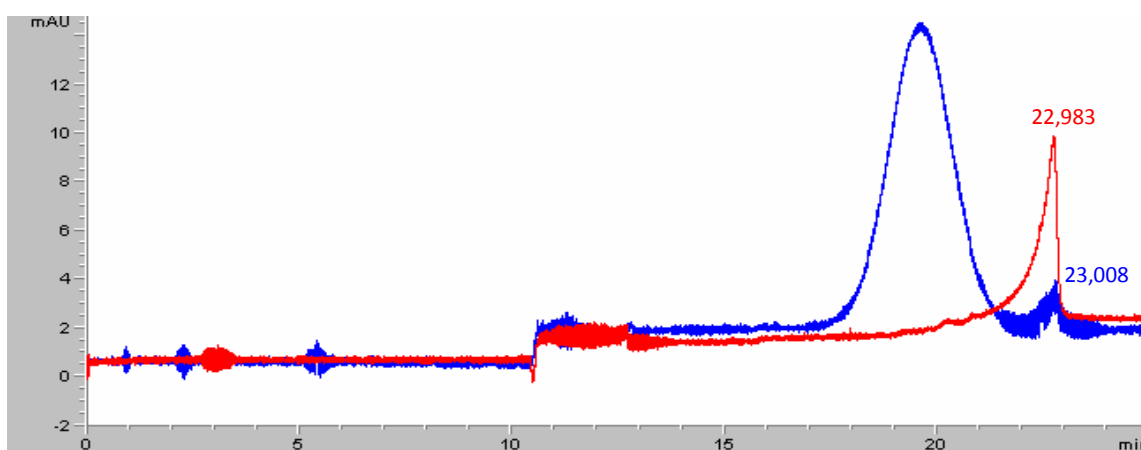


Figura 23 – Sobreposição das análises das amostras de conjugado PSC-TT 0510 (azul) e do PSC-oxi 0210 (vermelho). Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 10, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 60 segundos. Detecção por UV 192 nm.

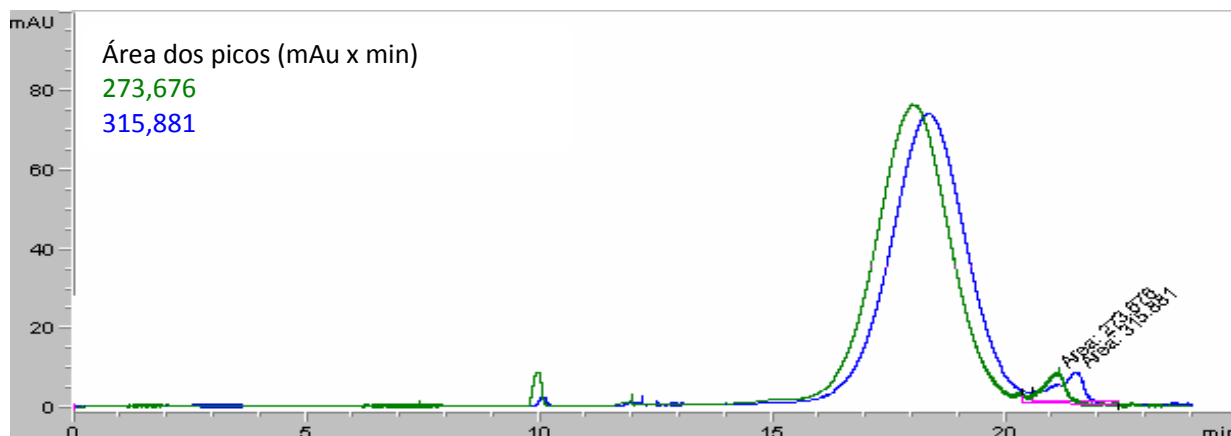


Figura 24 – Sobreposição das análises da amostra de conjugado PSC-TT 0510 (verde) e de sua fortificação com 20% de PSC-oxi 0210 (Azul). Condições de análise: Tampão TBNa 50 mM, pH 10, 30 kV, 40°C, em coluna de sílica fundida de 104 cm de comprimento efetivo, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

### 4.3.2. Quantificação do Conteúdo de Polissacarídeo Livre

#### 4.3.2.1. Confeção da Curva analítica em tampão

Para quantificar o PSC livre foi necessário preparar uma curva analítica utilizando como padrão o PSC-oxi, que possui tempo de migração semelhante ao tempo de migração do segundo pico observado na amostra do conjugado. Para isso, baseado nas concentrações de açúcar livre presentes nas vacinas conjugadas, foram avaliados sete pontos de concentrações equidistantes, como observado no Quadro 4. Verificou-se que as concentrações sugeridas eram possíveis de serem detectadas e apresentavam um acréscimo de área diretamente proporcional ao aumento da concentração. Em função desta observação, foi iniciada a confeção da curva, a partir de duas soluções estoque genuínas (Figura 25).

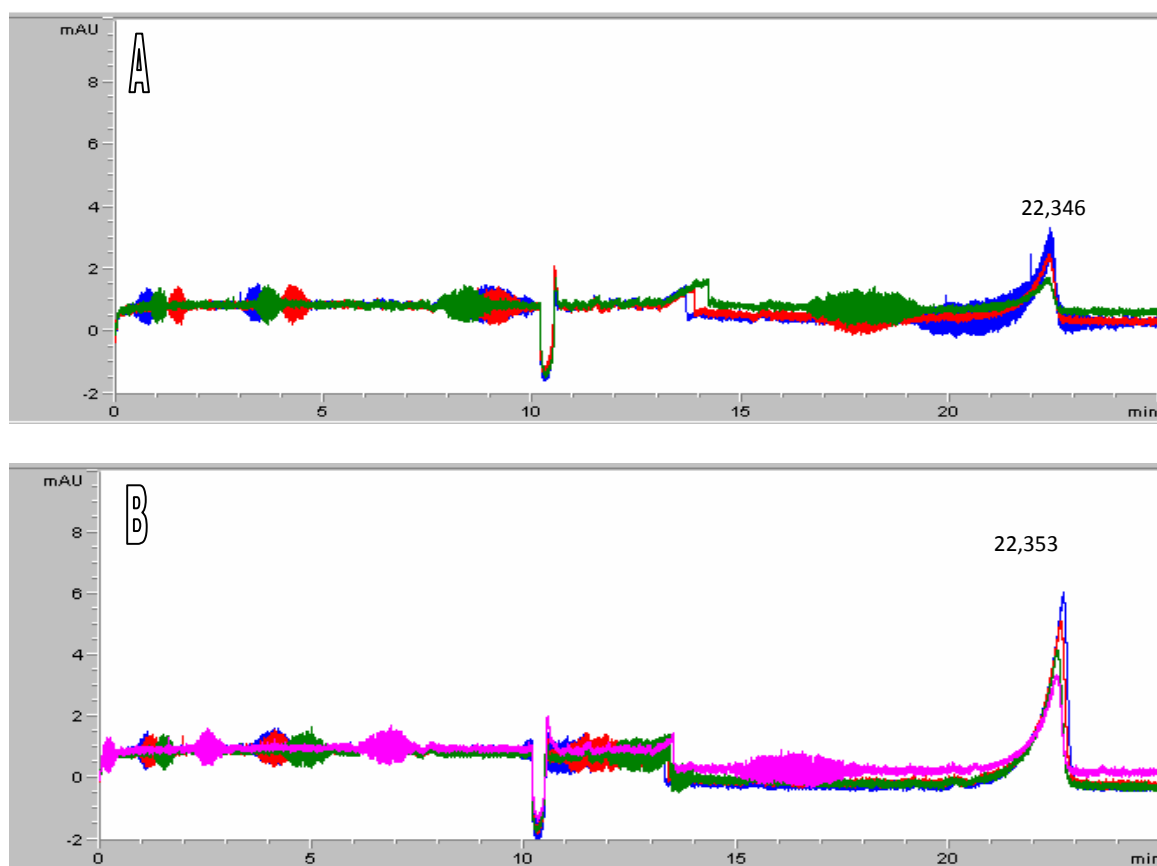


Figura 25 - Eletroferogramas sobrepostos referentes às concentrações de PSC-oxi 0210 usadas na confecção da curva analítica **A**: Verde 0,0235 mg/mL; Vermelho 0,047 mg/mL; Azul 0,070 mg/mL **B**: Rosa 0,094 mg/mL; Verde 0,1175 mg/mL; Vermelho 0,141 mg/mL; Azul 0,1645 mg/mL. Análise utilizando tampão TBNa 50 mM, pH 10,0, 30 kV, 40 °C. Detecção por UV 192 nm.

#### 4.3.2.1.1. Teste de Linearidade

A curva final foi avaliada utilizando o MMQO, com um intervalo de confiança de 95% (Figura 26). Para realizar a avaliação pelo MMQO foram retirados valores aberrantes, pelo método Jackknife, sendo excluídos dois valores analisados para que fossem satisfeitas as premissas do método, que se relacionam aos resíduos de regressão e dizem respeito aos testes de normalidade, autocorrelação e homogeneidade das variâncias dos resíduos (Figura 27).



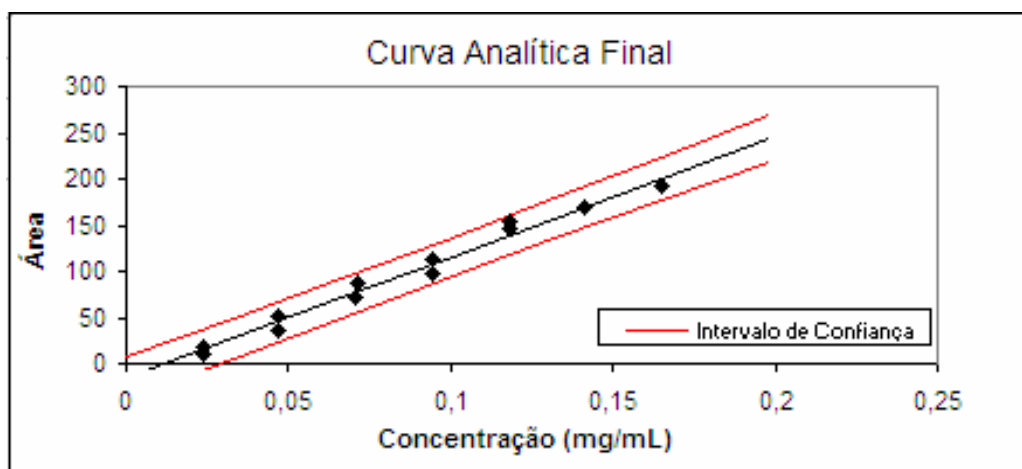


Figura 26 - Curva analítica final confeccionada em tampão mostrando a distribuição dos pontos da curva depois de retirados os valores aberrantes.

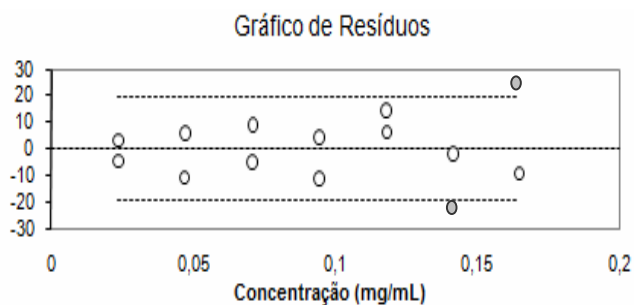


Figura 27 – Figura exploratória dos resíduos de regressão da curva analítica

#### 4.3.2.1.2. Teste de normalidade

A análise dos dados utilizados para a confecção da curva da Figura 26 mostrou que os dados seguem a distribuição normal através do coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação calculado (0,98) foi superior ao valor crítico estabelecido (0,93) com intervalo de confiança de 95%; não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem uma distribuição normal ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.2.1.3. Teste de Homogeneidade das variâncias dos resíduos

Para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado o teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe. Verificou-se que o valor de t encontrado (0,299) para o teste é inferior ao valor tabelado (2,23) e que a significância do teste (0,77) é superior a 0,05. Desta forma, a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos de regressão são constantes foi aceita, havendo homogeneidade entre as mesmas.

#### 4.3.2.1.4. Teste de Independência de Resíduos

A autocorrelação entre os resíduos foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. O valor calculado para o teste foi igual a 1,50, superior ao valor crítico de 1,33. Desta forma, foi aceita a hipótese de que há independência entre os resíduos.

#### 4.3.2.1.5. Análise de variância dos resíduos e desvio de linearidade

A regressão linear bem como o ajuste ao modelo foram confirmados através do teste ANOVA ( $p = 7 \times 10^{-10}$ ). Os dados são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 – Resultados da análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ( $\alpha = 0,05$ )

<b>Fonte</b>	<b>G.L.</b>	<b>SQ</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Regressão	1	$3,94 \times 10^4$	$3,94 \times 10^4$	$5,03 \times 10^2$	$7,00 \times 10^{-10}$
Resíduos	10	$7,84 \times 10^2$	$7,84 \times 10$		
Ajuste	5	$3,52 \times 10^2$	$7,04 \times 10$	$8,13 \times 10^{-1}$	$5,87 \times 10^{-1}$
Total	11	$4,02 \times 10^4$			

Regressões significativas e o ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ) foram comprovados pelas análises estatísticas como visto no Quadro 5. A equação final de

regressão foi  $y = 1316,2x - 16,235$ . Os critérios exigidos pelo método dos MMQO estão dispostos no Quadro 6.

Quadro 6 – Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO

Homogeneidade de variância	
Há Homogeneidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )	
Não há autocorrelação	$d > Du$
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

A análise de todos os resultados mostra que o método de quantificação do PSC livre, utilizando o modo CZE, segue um modelo linear.

#### 4.3.2.2. Confeção da curva analítica utilizando a Matriz

Para este ensaio, foram confeccionadas novas curvas analíticas para a verificação da ocorrência do efeito matriz, utilizando as mesmas concentrações de PSC, descritas no Quadro 4, porém usando, primeiramente o solvente (tampão TBNa), como realizado no ítem 5.3.2.1. e depois utilizando como solvente o conjugado PSC-TT 0510 (Figura 28).

Após confeccionar as duas curvas e retirar os valores aberrantes presentes nas análises, realizou-se um teste T para avaliar se as curvas eram equiparáveis ou não (Quadro 7). Para avaliar o grau de semelhança entre os resultados observados analisou-se a similaridade entre os coeficientes angular (b) e linear (a) das duas retas obtidas e verificou-se que todos os valores ( $t_a = 2,79$ ;  $t_b = 3,28$ ) estavam acima do valor de t calculado para esta distribuição ( $t_{tab} = 2,09$ ). Desta forma, pode-se dizer que foi rejeitada a hipótese nula, havendo então, influência da matriz na análise. Em função deste resultado, todas as análises posteriores foram realizadas utilizando-se a matriz para a quantificação do PSC livre.

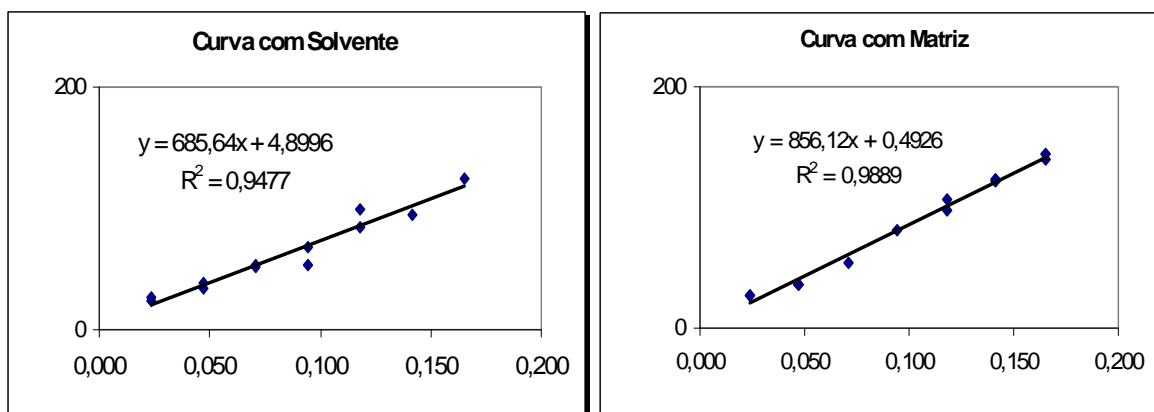


Figura 28 – Curvas de PSC-oxi 0210 confeccionadas no solvente e na matriz para a avaliação do efeito matriz.

*Quadro 7* – Áreas encontradas na avaliação de efeito matriz nas análises em TBNa e no conjugado PSC-TT 0510. Em negrito, valores aberrantes retirados da análise.

Padrão	Concentração (mg/mL)	Área (TBNa)	Área (Matriz)
23,5ppm	0,024	27	27
23,5ppm	0,024	24	27
47ppm	0,047	34	36
47ppm	0,047	38	36
70,5ppm	0,071	54	43
70,5ppm	0,071	51	54
94ppm	0,095	54	<b>66</b>
94ppm	0,094	69	82
117,5ppm	0,118	99	97
117,5ppm	0,118	84	106
141ppm	0,141	95	122
141ppm	0,141	<b>65</b>	123
164,5ppm	0,165	<b>158</b>	140
164,5ppm	0,165	125	145

#### 4.3.2.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A partir da curva construída na matriz determinaram-se os limites de detecção e quantificação da análise realizada e verificou-se, respectivamente, os valores de 0,0154 e 0,0454 mg/mL. Como a primeira concentração da curva (0,024 mg/mL ou 5%) se encontra abaixo do LOQ do método, optou-se por trabalhar com apenas seis concentrações em duplicata.

#### 4.3.2.4. Avaliação da coluna de 40 cm

As análises utilizando a coluna de 104 cm eram satisfatórias, entretanto o tempo de análise era muito longo, cerca de 25 minutos. Desta forma, estudou-se a separação em uma coluna de 40 cm de comprimento. O tempo de análise nesta nova condição foi de cerca de 7 minutos com migração dos picos de 4,487 minutos para o conjugado e 5,159 minutos para o polissacarídeo, o que tornou a análise bastante promissora quando relacionada à análise na coluna maior. Entretanto, foi verificada uma resolução de separação inferior à observada na coluna de 104 cm (Figura 29).

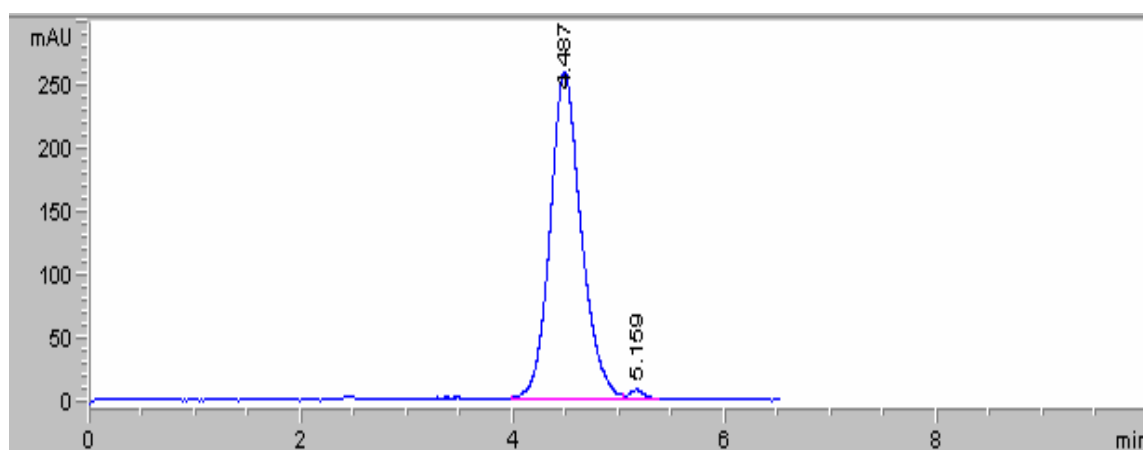


Figura 29 – Eletroferograma referente à separação do conjugado PSC-TT 0510 na coluna de 40 cm. Condições de análise: TBNa 50 mM, SDS 25 mM, 30 kV, 40°C, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

Foram confeccionadas curvas analíticas no tampão e na matriz assim como realizado no item 5.3.2.2., com as mesmas concentrações. Como observado anteriormente foi também verificada a ocorrência de efeito matriz e de linearidade nas distribuições. Entretanto, a separação observada quando foi feita a adição de 20% de PSC-oxi à matriz (conjugado) não foi eficiente o que impossibilitou a realização das análises utilizando esta coluna (Figura 30).

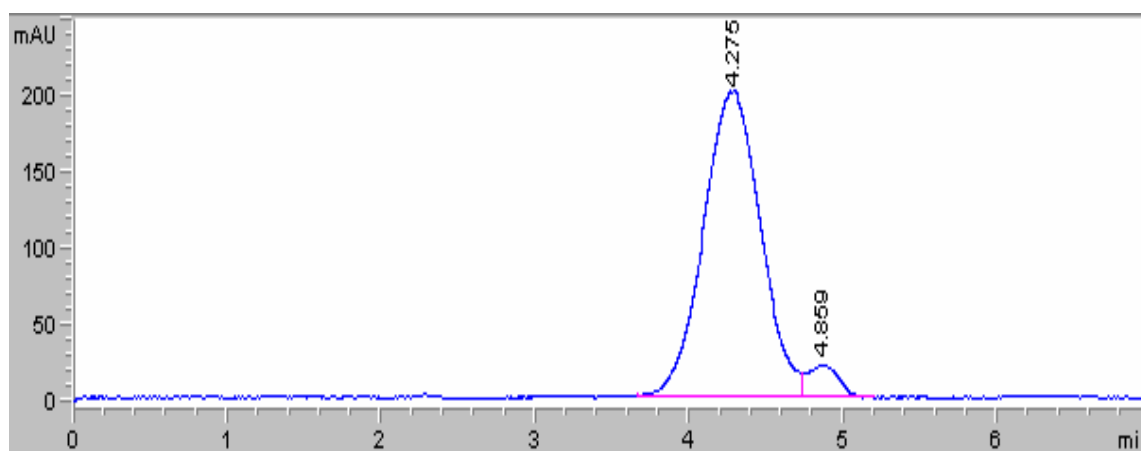


Figura 30 – Eletroferograma referente à fortificação da amostra de conjugado PSC-TT 0510 com o PSC-oxi 0210 na coluna de 40 cm. Condições de análise: TBNa 50 mM, SDS 25 mM, 30 kV, 40°C, injeção hidrodinâmica 30 mbar por 10 segundos. Detecção por UV 192 nm.

#### 4.3.2.5. Avaliação da Repetitividade

Após realizar os ensaios para avaliação da linearidade e da confirmação da ocorrência de efeito matriz neste tipo de análise, a amostra de conjugado PSC-TT 0510 foi testada para avaliação da repetitividade dos resultados. Foram realizadas introduções a partir de tubos diferentes com até quatro repetições por tubo que apresentaram um CV de 2,02% (Quadro 8). Os valores para comparação encontrados utilizando as equações 1 e 2, descritas no item 4.2.3.6., foram respectivamente: PRSD = 2,015 e HORRAT = 0,27, sendo os valores satisfatórios para os critérios de aceitabilidade.

Quadro 8 - Análise de repetitividade utilizando 4 introduções por tubo.

Nº do tubo	Tempo de migração conjugado (minutos)	Tempo de migração PSC (minutos)	Área do PSC
1	19,70	22,78	207,50
1	19,75	22,84	209,40
1	19,71	22,80	207,20
1	19,72	22,72	205,30
2	19,74	22,82	171,70
2	19,75	22,83	203,20
2	19,76	22,85	202,10
2	19,91	23,14	210,30
3	19,95	23,07	168,00
3	20,01	23,15	175,60
3	20,09	23,32	164,80
3	20,17	23,55	213,50
Media	19,93	23,16	210,50
Desvio Padrão	0,34	0,55	4,24
CV	1,69	2,36	2,02

#### 4.3.2.6. Avaliação da Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada em cada nível de concentração através do desvio padrão de precisão intermediária ( $S_i$ ) encontrado. Desta forma, foi possível observar que o nível que apresenta maior precisão para a realização das análises é o de concentração 20% ou 0,094 mg/mL, que apresentou  $S_i = 1,63$  e o de precisão mais baixa foi àquele na concentração de 35% (0,1645 mg/mL) de PSC-oxi, com  $S_i$  igual a 4,92, como pode ser observado no Quadro 9.

Quadro 9 – Resultados obtidos na análise de precisão intermediária realizadas por diferentes analistas em dias diferentes.

	Analista 1	Analista 1	Analista 2	Analista 2		
Concentração de PSC	Área	Área	Área	Área	Somatório	Si
10%	228,45	228,50	221,32	215,32	88,87	2,36
10%	227,12	228,90	217,10	223,64		
15%	253,07	265,60	245,60	235,65	62,55	1,98
15%	251,39	267,60	246,27	243,08		
20%	281,09	295,60	275,07	270,61	42,53	<b>1,63</b>
20%	277,88	291,00	274,90	267,30		
25%	307,79	317,40	294,25	298,65	189,77	3,44
25%	313,43	314,10	306,37	299,03		
30%	345,73	350,80	334,07	329,98	30,92	1,93
30%	343,33	355,50	333,92	331,72		
35%	419,29	409,90	368,35	354,80	388,00	<b>4,92</b>
35%	412,03	417,70	360,96	369,62		

#### 4.3.2.7. Avaliação da Robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas variações de pH do eletrólito e temperatura do cassete durante as análises. Observou-se através dos padrões de “Skewness” e “Kurtosis” que os dados obtidos seguiam uma distribuição normal. Após a realização da análise de variância (ANOVA, Teste de LSD,  $p > 0,05$ ), verificou-se que os resultados obtidos ao fazer a variação de pH de 10,0 para 9,5 e 10,5 não são significativamente diferentes, ou seja,  $p = 0,79$ .

Para a avaliação da variação na temperatura de análise foi verificada a normalidade dos dados pelo método descrito acima e, posteriormente, a análise de variância apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Desta forma, observou-se que todas as variações de temperatura realizadas, de 40°C para 35°C e 45°C, alteraram significativamente a resposta do método.



#### 4.3.2.8. Quantificação do percentual de açúcar livre em diferentes lotes de conjugados

Para quantificar o teor de açúcar livre nos lotes de conjugados foram construídas curvas analíticas dissolvidas na matriz, por existir interferência da matriz na análise. Foram retirados os valores aberrantes e comprovada a satisfação das premissas do método do MMQO, demonstrando a linearidade na distribuição, para cada lote de conjugado.

Foram analisados, primeiramente, os conjugados PSC-TT 0410 e PSC-TT 0510 que foram produzidos com apenas um mês de diferença, em 2010 (Quadro 3). Entretanto, as análises só foram realizadas quase um ano após a produção e por isso, obtiveram-se as concentrações de açúcar de 38,29% para o lote 0410 e 41,64% para o lote 0510 (Quadro 11).

Já o conjugado PSC-TT 0111, obtido recentemente, em 2011, foi analisado imediatamente após a produção (tempo zero), 30 e 60 dias depois, verificando-se valores de 19,08, 22,00 e 21,03%, conforme observado no Quadro 10. A análise realizada 90 dias após a produção não pôde ser quantificada, pois foi verificada uma deformação no perfil do conjugado, que não era observada nas análises anteriores (Figura 31).

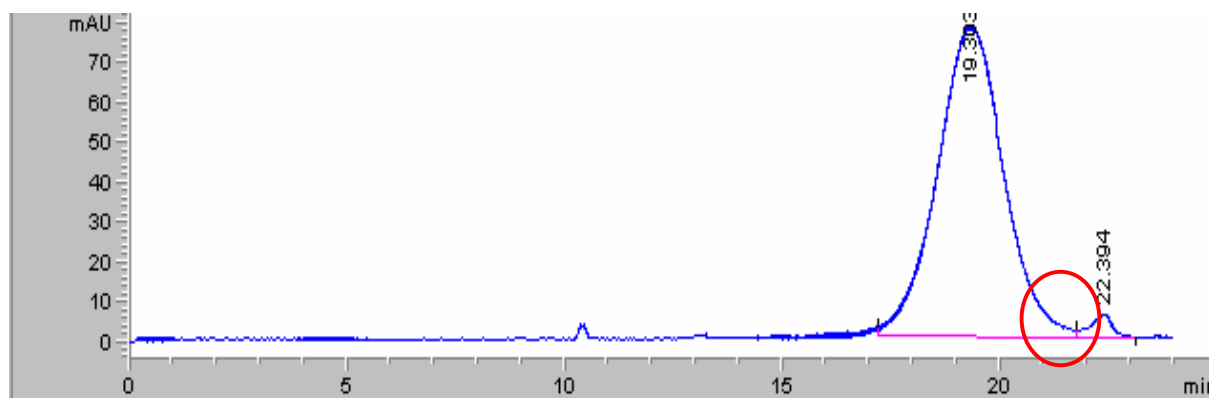


Figura 31 - Eletroferograma referente ao perfil do conjugado PSC-TT 0111 analisado após 90 dias de estocagem.

A análise estatística dos diferentes tempos de estocagem foi realizada visando verificar se os valores obtidos para a quantificação de PSC livre eram significativamente

diferentes. Observou-se que nos primeiros 60 dias, após a produção, não houve modificação relevante nos valores referentes ao conteúdo de PSC livre no lote estudado ( $p = 0,6108$ ).

Quadro 10 – Quantificação do PSC livre nos conjugados descritos, ressaltando a equação da reta, a concentração em mg/mL e o percentual deste componente presente no conjugado.

<b>Lotes PSC-TT</b>	<b>Equação da Reta</b>	<b>Concentração de PSC livre (mg/mL)</b>	<b>Percentual de PSC livre</b>
<b>0410</b>	$y = 1244,9x + 243,65$	0,196	41,64%
<b>0510</b>	$y = 855,39x + 153,94$	0,180	38,29%
<b>0111 (t=0d)</b>	$y = 1307x + 117,19$	0,090	19,08%
<b>0111 (t=30d)</b>	$y = 1228,1x + 127,19$	0,103	22,00%
<b>0111 (t=60d)</b>	$y = 1090,5 + 109,22$	0,100	21,31%

## 5. DISCUSSÃO

A meningite bacteriana aguda continua sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças. As crianças menores de dois anos de idade são particularmente suscetíveis a infecções causadas por bactérias encapsuladas devido a sua resposta imatura a antígenos polissacarídicos. (Makwana e Riordan 2007). Para combater as infecções causadas por estas bactérias foram utilizadas, primeiramente, vacinas polissacarídicas. Entretanto, este tipo de vacina é capaz de induzir apenas uma baixa concentração de anticorpos e estimular de maneira limitada a memória imunológica, sendo ineficaz em crianças menores de dois anos, o principal grupo de risco da doença invasiva severa (Diez-Domingo et al 2010).

Por este motivo, foram desenvolvidas vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína carreadora visando aumentar a imunogenicidade dos antígenos polissacarídicos, sendo a vacina contra Hib a primeira a ser desenvolvida, seguida das vacinas contra alguns sorotipos de pneumococos e grupos de meningococos (Goldblatt 2000).

A *N. meningitidis* é uma das principais causadoras de doença invasiva em crianças menores de dois anos. A proporção de casos atribuídos ao meningococo do grupo C é bastante variável no mundo, mas no Brasil atualmente cerca de 70% dos casos de DM são atribuídos a este grupo, em uma faixa etária que se estende até adultos jovens (com cerca de 20 anos). Apesar deste número elevado de casos, até o momento, apenas são produzidas no Brasil vacinas polissacarídicas, para controle de surtos epidêmicos (SIREVA II 2009; Bastos et al 2010).

Desta forma, há onze anos, Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina meningocócica C conjugada brasileira, utilizando a TT como proteína carreadora. A conjugação do polissacarídeo meningocócico à TT é realizada através do método

modificado de aminação redutiva, que permite formação do conjugado de maneira mais rápida através da introdução de grupamentos mais reativos na proteína (Lee e Frasch 2005; Jessouroun et al 2005; Silveira et al 2007). Silveira et al (2007) avaliaram ainda, a imunogenicidade dos conjugados em ensaios com detecção de anticorpos, incluindo o índice de avides e a atividade bactericida (Silveira et al 2007).

No processo de obtenção da vacina foram desenvolvidas todas as etapas de produção e purificação de lotes de conjugado obtidos em diferentes escalas. Da mesma forma, foram padronizados vários métodos de controle de processo dos componentes intermediários, do conjugado e do produto final, para a verificação da presença de resíduos dos reagentes que foram utilizados na etapa de conjugação (Silveira 2007). Entretanto, para o controle da vacina meningocócica C conjugada brasileira ainda não foi desenvolvido um método adequado de quantificação de proteína livre e em relação à avaliação do teor de açúcar livre, tem sido utilizado um método descrito na literatura, mas que apresenta pouca sensibilidade e que necessita de tratamento prévio da amostra (Lei et al 2000; Silveira et al 2007). Neste contexto, o presente trabalho estudou métodos de controle de qualidade adequados para a separação e quantificação dos componentes livres na vacina conjugada através da técnica de EC.

Na literatura é descrita a influência do alto teor de componentes livres, TT e polissacarídeo, na imunogenicidade de vacinas conjugadas (Granoff et al 1998; Richmond et al 2000; Pöllabauer et al 2009; Dagan et al 2010). Por este motivo, é necessário estabelecer limites para a presença destes componentes em excesso, que normalmente são preconizados pela OMS, através de métodos confiáveis e validados (WHO 2000; WHO 2004).

São descritos diferentes métodos, principalmente métodos físico-químicos e cromatográficos, para a separação e detecção de componentes livres (Gotschlich et al 1967; Lei et al 2000; Kim et al 2005). Os principais métodos empregados para esta finalidade apresentam fases de extração e preparo da amostra para posterior análise. Entretanto, estas etapas acabam dificultando a validação de uma metodologia para emprego em rotina de produção de vacinas. A técnica de EC é bastante promissora por não necessitar de preparo da amostra, gastar pequenas quantidades tanto de amostra

como do eletrólito de análise, apresentar um alto poder de resolução e, ainda poder ser executada em um curto intervalo de tempo (Agilent Technologies 2009).

A EC, nos últimos quinze anos, vem emergindo como uma técnica alternativa para a separação de vários compostos de importância industrial, clínica, biomédica e ambiental. As características determinantes para a utilização da técnica são a eficiência, poder de separação, velocidade, automatização e a diversidade de esquemas de detecção e injeção utilizados. Esta técnica apresenta muitos modos de operação como a CZE, a MEKC, CIEF, entre outros, que permitem a separação e quantificação de compostos de diferentes naturezas através da escolha de um eletrólito adequado ao tipo de separação (Tavares 1996).

Deste modo, Lamb e colaboradores (2000, 2005) publicaram alguns artigos que descrevem a separação de proteína livre em vacinas conjugadas contra diferentes grupos de pneumococcos e meningococcos e a separação e quantificação do teor de polissacarídeo presente em vacinas polissacarídicas contra cinco diferentes grupos de meningococcos, utilizando a técnica de EC. Estes autores foram os primeiros que publicaram estudos empregando este tipo de análise no controle de qualidade de vacinas conjugadas.

No presente estudo, foram realizados ensaios utilizando a técnica de EC variando-se diferentes parâmetros de análise como a temperatura, pH do tampão, tipo e concentração de eletrólito e tensão, tomando-se como base os ensaios descritos por Lamb et al (2000). Inicialmente, foram empregadas as condições propostas por estes autores para a separação da proteína livre, empregando-se o modo de MEKC. Entretanto, o eletroferograma apresentou muito ruído, possivelmente, devido ao acréscimo de uma concentração muito elevada de SDS ao eletrólito. Além disto, foi observada a falta de estabilização da coluna no tampão utilizado, não sendo possível avaliar a proteína em questão.

Em outra abordagem utilizou-se a introdução de CD ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em diferentes concentrações, a fim de verificar se algum dos componentes livres do conjugado iria interagir com estas moléculas, formando complexos e, desta forma, levando à separação dos componentes. Entretanto, não foi observada interação das CD com

nenhum dos componentes citados, não havendo modificação dos picos obtidos anteriormente.

Como a separação dos componentes não apresentou boa resolução, optou-se por realizar os experimentos sem acrescentar SDS, ou seja, empregando-se o modo CZE. O primeiro parâmetro a ser avaliado foi a temperatura. Deste modo, foram feitas variações de 20°C a 45°C e verificou-se que o aumento da temperatura apresentava impacto direto sobre o tempo de análise, reduzindo-o de forma significativa. A temperatura do cassete igual a 40°C foi escolhida, desde que temperaturas superiores desestabilizaram a linha de base e àquelas inferiores apresentaram um maior tempo de migração, sem efeitos sobre a separação.

Apesar de não existirem muitos artigos utilizando a EC na produção de vacinas conjugadas foi observado o efeito da temperatura nos estudos de Nogueira et al (2008), para a análise de medicamentos. Este grupo descreveu a determinação da rupatadina em formulações farmacêuticas utilizando o modo MEKC. Os pesquisadores verificaram que análises em temperaturas mais altas, neste caso 35°C, favoreciam a separação do dado composto.

Posteriormente, foram feitas análises variando-se o pH do eletrólito, que é o parâmetro mais relevante na determinação de uma melhor resolução de separação (Camilleri 1995). Das análises realizadas em pH básico, a melhor separação foi obtida em pH 9,3, onde foi verificada uma boa separação entre a amostra de conjugado e da TTH. Entretanto, ainda existia uma área de sobreposição entre os dois picos que impedia a quantificação do conteúdo real de proteína livre. Em função das características estruturais das espécies moleculares presentes na vacina (conjugado, proteína e polissacarídeo), tomando-se como base os grupos funcionais e os ensaios preliminares de controle de qualidade da vacina conjugada verificou-se que estas moléculas apresentam pKa em uma faixa inferior a 5. Por este motivo, foi iniciada a busca de uma condição melhor de separação nesta faixa de pH. Como a faixa de tamponamento do TBNa ocorre em valores de pH básicos, foi necessário utilizar o tampão citrato de sódio que possui faixa ótima de trabalho entre o pH 2 e 6. Com a condição de pH 5,2, valor obtido quando se dissolvia o citrato de sódio, foi estudada a

melhor concentração do tampão e verificou-se que com 10 mM as análises ocorriam em menor tempo e apresentavam apenas um pico no eletroferograma, após a introdução do conjugado, demonstrava uma melhor resolução e menor alargamento.

Em seguida foi estudado o pH ideal para a realização das análises. Os perfis detectados para o conjugado e a proteína ativada, analisados em separado, em pH 5,2, foram sobrepostos e apresentaram tempos de migração com diferença significativa de 2,857 minutos. Esta diferença sugere que possivelmente as duas moléculas apresentariam uma ótima resolução de separação se estivessem presentes na mesma amostra. Com o objetivo de identificar a presença de um possível pico correspondente à proteína livre no perfil do conjugado, realizou-se uma fortificação desta amostra adicionando-se a TTH. Entretanto, foi observado um pico único no eletroferograma obtido, demonstrando a co-migração das espécies, provavelmente pela ocorrência de uma ligação entre os dois componentes pela diferença de cargas das moléculas, na condição estudada. É importante ressaltar também a ocorrência da inversão dos picos da TTH e do conjugado na faixa de pH entre 4 e 5,2, possivelmente, por se tratar de uma região próxima ao ponto isoelétrico da TTH e por isso pode ter ocorrido uma inversão de cargas.

No estudo de glicídeos por EC, Campa et al (2008) descreveram o efeito da variação do pH na separação de açúcares ácidos, demonstrando a separação destes açúcares liberados após hidrólise de polissacarídeos ácidos e de açúcares ligados a glicoproteínas.

As análises realizadas com a proteína ativada em diferentes condições demonstraram que em pH 9,3, o seu perfil era composto por dois picos. O segundo pico foi identificado como sendo referente à proteína nativa, através da semelhança entre os tempos de migração observados no segundo pico da proteína ativada e o pico da proteína nativa isolada, 7,522 e 7,512 minutos, respectivamente. Estes resultados sugeriram que a espécie ideal para os ensaios de fortificação era a proteína nativa, provavelmente porque a espécie ativada teria sido consumida durante a reação de conjugação e a proteína nativa corresponderia à maioria da proteína livre presente no conjugado.

A ativação da proteína é realizada com o objetivo de favorecer a formação do conjugado, permitindo uma reação mais eficiente, onde são introduzidos grupos hidrazida altamente reativos, aos grupos carboxílicos da proteína carreadora. Estes grupos reagem mais favoravelmente com os grupos aldeído presentes no PSC-oxi do que os grupos  $\epsilon$ -amino da proteína nativa, devido ao menor pKa dos grupos hidrazida. Além disto, os grupos amino presentes na proteína nativa estão em menor número e comprometidos com o processo de detoxificação da toxina tetânica à TT, após o tratamento com formaldeído (Silveira et al 2007). O mesmo processo de ativação da proteína é utilizado na produção de uma vacina conjugada contra *N. meningitidis* do grupo A, que recentemente foi introduzida no programa de imunização de alguns países da África como Burkina Faso e Mali (LaForce et al 2009; Lee et al 2009; MVP 2011).

Os resultados observados mostraram a necessidade de otimizar a reação de ativação da TT, visando alcançar um maior rendimento. Este estudo favoreceria a ocorrência da reação de conjugação, já que a proteína nativa necessita de um tempo maior para se ligar ao polissacarídeo, dificultando a formação de conjugados no tempo proposto (Constantino et al 1992; Lees et al 2006). A geração de grupos mais reativos na TT permitiria uma maior ligação entre a proteína e o polissacarídeo, o que acarretaria na redução do conteúdo destes componentes livres no conjugado e, conseqüentemente, aumentaria o rendimento da reação. Os resultados observados nas análises feitas com a proteína ativada utilizando a metodologia de EC possibilitaram uma separação completa das espécies ativada e nativa e, portanto, pretende-se monitorar a otimização da reação de ativação através do método estudado.

Por outro lado utilizando o modo CZE não foi possível a observação direta do pico referente à proteína livre na amostra de conjugado. Desta forma retornou-se às condições de análise por MEKC e foram estudados outros parâmetros não explorados. Primeiramente, foi feito um estudo de diferentes concentrações de SDS e verificou-se que concentrações menores, entre 25 e 50 mM, não prejudicaram o perfil da análise como a concentração de 200 mM proposta por Lamb et al (2000). Em seguida foram avaliadas concentrações mais elevadas do eletrólito e estas permitiram uma melhor resolução entre os picos. Neste contexto, foi escolhida a concentração de 150 mM para



a realização das análises por esta não aumentar, significativamente, o tempo de execução do método. Verificou-se também, que temperaturas mais elevadas como 60°C, favoreciam a separação dos picos, apesar desta separação ainda se apresentar incompleta. Com a variação destes parâmetros foi possível observar um segundo pico na amostra do conjugado que apresentava tempo de migração similar àquele observado na proteína nativa. Além disso, ensaios de fortificação da amostra do conjugado com a proteína nativa demonstraram um aumento de área do segundo pico, corroborando se tratar da TT livre.

Os resultados obtidos após a variação de diversos parâmetros da análise do conjugado vacinal mostraram uma separação incompleta da proteína livre, necessitando de um tempo maior para o desenvolvimento da técnica, com a troca das características da coluna e, possivelmente, do modo de análise por EC. Desta forma, optou-se por seguir o desenvolvimento deste trabalho focando o estudo do teor de PSC livre, visto que a separação deste componente se mostrou promissora desde as primeiras análises, utilizando CZE, o que possibilitaria a quantificação e a validação da metodologia proposta.

Para a análise do PSC livre foram utilizadas algumas condições já estabelecidas para a separação da proteína livre, ou seja, tampão TBNa 50 mM, pH 9,3, 40°C e 30 kV. Utilizando estas condições foi observada a presença de dois picos na amostra do conjugado com uma boa resolução entre eles. A fim de otimizar a separação obtida foram estudados diferentes valores de pH para a análise dos compostos, conjugado e polissacarídeo, devido à significativa influência deste parâmetro no aumento da resolução (Kuhn e Hoffstetter-Kuhn 1993). Desta forma, foram realizados ensaios variando-se o pH do eletrólito de 9,5 a 10,5 e foi observada a melhor resolução de separação no pH 10, confirmada pela maior diferença entre os tempos de migração da amostra do conjugado e do PSC livre que foi de 3,414 minutos.

Após estudos utilizando o padrão (PSC-oxi), o segundo pico foi identificado como sendo relativo ao PSC livre presente no conjugado, desde que foi observado, após fortificação, um aumento de área em torno de 15,5%.

Alguns autores avaliaram o perfil de açúcar livre e o seu teor em conjugados

vacinais através de diferentes métodos. Cuello et al (2006) utilizaram uma reação com anticorpo anti-TT, para separar o açúcar livre do conjugado, e posteriormente, este teor foi determinado por cromatografia líquida de exclusão molecular. Entretanto o perfil cromatográfico relativo ao conjugado não foi demonstrado para que fosse avaliada a resolução de separação. Em outros estudos, utilizando a vacina contra Hib, Cuervo et al (2007) verificaram a estabilidade da vacina conjugada em diferentes temperaturas, utilizando como parâmetro o teor de polissacarídeo livre, aplicando a mesma técnica. Entretanto, no perfil do conjugado estudado não foi possível observar um pico referente ao polissacarídeo. Silveira (2007) empregou a mesma técnica proposta por Cuello et al (2006) e Cuervo et al (2007) para o monitoramento do perfil do conjugado, utilizado na produção vacina meningocócica C conjugada brasileira, e também não observou um perfil referente ao polissacarídeo livre. Lei et al (2000) descreveram um método para separação de polissacarídeo livre em vacinas conjugadas contra *N. meningitidis* utilizando a DT como proteína carreadora. Estes autores fizeram uma precipitação da amostra com DOC e determinaram o teor de açúcar livre presente no sobrenadante através de ensaios colorimétricos e de cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica. No entanto a metodologia aplicada por estes pesquisadores utiliza um tratamento prévio da amostra o que dificulta a validação do método.

Desta maneira, como a OMS recomenda diversos métodos para a avaliação de PSC livre (WHO 2004), dentre os descritos na literatura, a EC demonstrou-se como um dos métodos mais promissores para análises com esta finalidade, por ser observado um pico referente ao PSC livre com uma boa resolução de separação.

Um dos objetivos do presente estudo foi quantificar os componentes livres presentes no conjugado. Entretanto, a separação completa foi possível apenas para o açúcar livre. Desta forma, os parâmetros do método desenvolvido para a análise e quantificação do teor de açúcar livre foram estabelecidos e, posteriormente, validados conforme as normas estabelecidas pelos órgãos nacionais competentes ANVISA (2003), INMETRO (2010).

Inicialmente, foi necessário confeccionar uma curva analítica tomando como base a concentração máxima de PSC livre de 20%, proposta para a vacina contra Hib,

conjugada à anatoxina tetânica (Farmacopéia Européia 2005), desde que ainda não existem limites estabelecidos para a vacina contra meningococo do grupo C (WHO 2004). Foram realizadas análises para verificar se as concentrações sugeridas eram detectáveis pelo aparelho e se não estavam na zona de ruído. Após esta avaliação obteve-se os valores de área para cada ponto da curva analítica em duplicata e estes valores foram avaliados de acordo com o MMQO. A partir da curva analítica obtida foram estudadas as premissas propostas pelo método MMQO e verificou-se que os resíduos apresentavam uma distribuição normal, com homogeneidade entre as variâncias, independência e, portanto, não havia desvio de linearidade entre os parâmetros estudados.

Entretanto, para avaliar a seletividade da análise foram feitos ensaios para avaliação do efeito matriz, ou seja, interferência de algum componente da amostra que fosse capaz de alterar os resultados obtidos. Ao construir as novas curvas analíticas, com o menor intervalo possível entre as análises foram feitas curvas uma no solvente e uma na matriz e verificou-se que havia diferença entre estas curvas ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ ). Este resultado demonstra a ocorrência de efeito matriz na amostra. Desta forma, todas as curvas construídas para a quantificação do PSC livre, utilizando o método proposto, foram confeccionadas diluindo-se o PSC-oxi na matriz, ou seja, no conjugado vacinal. Após a confecção da curva analítica os dados obtidos foram avaliados pelo MMQO.

As análises utilizando os parâmetros determinados apresentavam uma boa resolução, mas o tempo de corrida ainda era muito extenso (25 minutos). Por este motivo, foram realizados os mesmos experimentos usando uma coluna menor, de 40 cm de comprimento, a fim de reduzir o tempo de análise. Com a coluna sugerida as análises passaram a ser executadas em 7 minutos, em média, o que tornou ainda mais promissor o método em questão. Entretanto, quando foi realizada a adição de padrão de PSC-oxi ao conjugado, para quantificar o seu teor no lote estudado, houve uma diminuição na resolução de separação, fato que comprometeu a quantificação adequada do componente livre. Em função disto, as análises continuaram sendo realizadas utilizando a coluna de 104 cm, mesmo com um maior tempo de análise, seguindo-se, então com a validação da metodologia.

Com os dados obtidos utilizando na coluna de maior comprimento foram determinados os seus limites de detecção e quantificação. Foram encontrados os valores de 0,0154 e 0,0454 mg/mL para o LOD e LOQ, respectivamente. O valor de LOD foi inferior ao primeiro ponto da curva analítica, porém o valor de LOQ estava localizado acima do primeiro ponto da curva. Desta forma, a primeira concentração proposta para a curva analítica (0,024 mg/mL ou 5%), foi descartada por não proporcionar uma análise confiável. As análises posteriores foram realizadas utilizando apenas seis pontos para a confecção da curva analítica com menor concentração de 0,047 mg/mL ou 10% de PSC-oxi.

Após a avaliação da linearidade da curva analítica seguiu-se com a validação do método através da realização das análises de repetitividade, utilizando a amostra de conjugado PSC-TT 0510. Foram feitas introduções a partir de três tubos testados quatro vezes e foi encontrado um coeficiente de variação de 2,02%. Através da equação de Horwitz e pela utilização dos valores obtidos para o cálculo dos valores de HORRAT, foi possível observar que a repetitividade da análise satisfazia aos critérios de aceitabilidade para a precisão de um método, ou seja, um valor de HORRAT menor ou igual a dois (INMETRO 2010).

A precisão intermediária foi avaliada variando-se o analista e o tempo de análise, sendo o valor calculado de Si para cada nível de concentração utilizado para determinar a precisão de cada nível. Observou-se que o menor valor de Si foi encontrado na concentração de 20% (0,094 mg/mL) de polissacarídeo. Este valor justificou a escolha de 20% como sendo o valor central para a distribuição das concentrações, havendo para ele uma maior confiabilidade dos resultados. Entretanto, na concentração de 35% foi encontrado o maior valor de Si. Em função da maior distância deste valor da concentração central da curva (20%) era esperada uma menor precisão nesta concentração. É importante ressaltar que apesar de não ser estabelecido um percentual de açúcar livre para a vacina meningocócica C conjugada, a faixa escolhida para aplicação do método (10% a 35%) é adequada e pode ser utilizada para o controle de qualidade destas vacinas.

Outro parâmetro de validação também estudado foi a robustez, que busca avaliar se influências de pequenas variações no método são capazes de modificar o resultado do teste. Desta forma, como não há fase de extração da amostra e nem preparo da mesma, foram feitas modificações na temperatura de análise e no pH do tampão. Foi observado que pequenas variações de pH, entre 9,5 e 10,5 não influenciaram diretamente o resultado podendo ser confirmado pela homogeneidade dos resultados encontrados. Já nas análises com pequenas variações de temperatura (35°C e 45°C) foram encontrados resultados significativamente diferentes dos obtidos a 40°C. Desse modo, verificou-se a possibilidade de utilizar eletrólitos com valores de pH diferentes do originalmente usado, dentro da faixa estudada, sem afetar o resultado final da análise. Além disso, observou-se a necessidade de um controle mais rigoroso na temperatura do cassete durante a análise, pois pequenas modificações neste parâmetro são capazes de gerar resultados não confiáveis na quantificação do PSC livre.

Após validar o método de quantificação do teor de açúcar livre utilizando um único lote de conjugado, outros lotes de conjugados também foram quantificados de acordo com o método proposto. A avaliação do conteúdo de açúcar livre é de extrema importância no desenvolvimento de vacinas conjugadas, por ser descrita a ocorrência de tolerância imunológica após a administração de repetidas doses da vacina polissacarídica contra a *N. meningitidis* dos grupos C, Y e W-135, em adultos e crianças (Richmond et al 2000; Jokhdar et al 2003; Granoff e Pollard 2007; Bröker e Veitch 2009). Além disto, as vacinas polissacarídicas são capazes de desenvolver uma fraca e limitada resposta imunológica no indivíduo. Granoff e Pollard (2007) descreveram a ocorrência de diferenciação de células B de memória em células produtoras de anticorpos, quando são feitas doses de reforço utilizando a vacina polissacarídica. Este fato justificaria a hiporresponsividade observada quando se administra vacinas polissacarídicas e inviabiliza o seu uso, assim como a utilização de vacinas conjugadas com alto teor de açúcar livre (Granoff e Pollard 2007; Bröker e Veitch 2009).

O conteúdo de PSC livre foi obtido, primeiramente, nos lotes PSC-TT 0410 e PSC-TT 0510, estes lotes foram produzidos há aproximadamente dez meses com intervalo de um mês entre as produções. As amostras utilizadas se encontravam em

meio líquido e apresentaram valores de açúcar livre de 38,29% e 41,64%, respectivamente, para os lotes PSC-TT 0410 e PSC-TT 0510. Estes valores estão acima do proposto para a vacina conjugada contra Hib utilizando a TT como proteína carreadora, que é de 20% (Farmacopéia Européia 2005). Entretanto, é descrita a redução da estabilidade do conjugado, durante o seu armazenamento em fase líquida, resultando no aumento do grau de despolimerização. Dessa forma os resultados obtidos estão de acordo com aqueles descritos anteriormente para a vacina Hib, devido às condições e ao tempo de estocagem (Jones et al 1996; Lemercinier 1997).

Recentemente foi descrita a importância do estabelecimento do tempo de estocagem sem modificação significativa da composição de produtos na indústria farmacêutica. (ANVISA 2010). Na área de produção de imunobiológicos é fundamental o estabelecimento do período de tempo em que os concentrados antigênicos podem ser estocados antes das etapas de processamento final, que constituem etapas limitantes no processo de obtenção das vacinas. Desta forma, para o planejamento adequado da produção de diferentes vacinas fornecidas ao programa de imunização de cada país é fundamental a determinação deste período máximo de estocagem.

A fim de conhecer a estabilidade do conjugado em meio líquido foi utilizado o teor de açúcar livre como parâmetro de avaliação. Um lote recém-produzido em Bio-Manguinhos (PSC-TT 0111) foi avaliado e obteve-se um conteúdo de açúcar livre de 19,08%, imediatamente após a produção e purificação do conjugado. Posteriormente, foram realizadas análises deste mesmo lote, 30, 60 e 90 dias após estocagem a 4°C. Para os períodos de 30 e 60 dias de estocagem foram encontrados, respectivamente, os valores de 22,00% e 21,31% de açúcar livre. Entretanto, a diferença entre estes valores quando relacionados ao valor obtido imediatamente após a produção, ou seja, sem estocagem, não foram relevantes (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Para o tempo de 90 dias houve uma modificação no perfil do conjugado o que impossibilitou a quantificação do componente livre. Desta forma, é possível inferir que este lote de conjugado estocado em meio líquido tem estabilidade entre 60 e 90 dias após a produção. Em função disto, posteriormente, será importante estabelecer o tempo máximo de estocagem dos

conjugados vacinais, utilizando diferentes lotes de conjugado, antes da realização das etapas de formulação, envase e liofilização dos lotes produzidos.

Para o monitoramento da consistência de produção dos lotes e para a avaliação da estabilidade da vacina conjugada é descrita a utilização do método de cromatografia de exclusão molecular (Plumb e Yost 1996; Von Hunolstein et al 1999). Alguns grupos descreveram o teor de açúcar livre em conjugados utilizando o polissacarídeo meningocócico do grupo C. Beuvery et al (1983) obtiveram um percentual de 10% de polissacarídeo livre após a conjugação com TT através do método da carbodiimida. Entretanto, os pesquisadores estudaram a adição de quantidades de polissacarídeo grupo C livre, na resposta de anticorpos (IgG) ao conjugado e não encontraram qualquer supressão desta resposta. Na avaliação feita por estes autores não foi descrita a metodologia utilizada para a determinação do polissacarídeo livre. Por outro lado, Cuello et al (2006) observaram um conteúdo médio de 21% após obtenção do conjugado, pelo método da carbodiimida, utilizando a mesma proteína carreadora.

A análise de todos os resultados correspondentes ao desenvolvimento de um método adequado de separação e quantificação do teor de açúcar livre da vacina meningocócica C conjugada brasileira, através de EC, descrita no presente estudo, fundamenta a introdução da metodologia proposta e validada para o controle de processo de lotes da vacina conjugada produzida por Bio-Manguinhos, sob condições de Boas Práticas de Fabricação, para estudos clínicos de Fase III a serem realizados em voluntários saudáveis do país e posteriormente, para o controle de rotina da vacina. Por outro lado, os resultados preliminares obtidos no estudo do teor de proteína livre da vacina conjugada servirão de base para o estudo de otimização da ativação da proteína e para o desenvolvimento de um método mais adequado à separação e quantificação deste componente livre.

O conhecimento da técnica de EC adquirido no presente estudo também poderá ser utilizado no controle de qualidade de outras vacinas conjugadas contra bactérias encapsuladas de interesse epidemiológico no Brasil, como *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, tanto na avaliação dos componentes livres, quanto na quantificação do conjugado vacinal.

## 6. CONCLUSÕES

- A melhor separação da proteína livre do conjugado vacinal foi obtida utilizando o modo MEKC da EC nas condições de tampão TBNa 150 mM acrescido de 25 mM de SDS, 60°C, 30 kV, pH 9,3. Entretanto, os modos CZE e MEKC de EC não foram capazes de promover uma separação completa da proteína livre nos lotes da vacina meningocócica C conjugada brasileira.
- Através da técnica de EC, utilizando o modo CZE, foi possível separar a proteína ativada da proteína nativa, o que demonstrou a necessidade de otimização da reação de ativação da proteína, a fim de favorecer a formação do conjugado vacinal. Além disto, é possível monitorar o rendimento da reação de ativação utilizando a técnica de EC como controle de processo desta etapa;
- A separação completa do polissacarídeo livre do conjugado vacinal foi obtida utilizando o modo CZE nas condições de tampão TBNa 50 mM, 40°C, 30 kV, pH 10, com coluna de 104 cm de comprimento efetivo x 50 µm de diâmetro interno;
- O segundo pico verificado no eletroferograma referente ao conjugado por CZE corresponde ao polissacarídeo livre devido à equivalência dos tempos de migração com o PSC-oxi e ao aumento da área referente ao PSC livre quando foi realizada a fortificação;
- As curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz apresentaram diferença significativa confirmando a ocorrência de efeito matriz na análise. Desta forma, para a quantificação do açúcar livre no conjugado é necessário preparar a curva analítica na matriz;



- O método desenvolvido atendeu aos limites estabelecidos para os parâmetros de validação: LOD (0,0154 mg/mL), LOQ (0,0454 mg/mL), linearidade (faixa de 0,047 e 0,164 mg/mL), repetitividade ( $\text{HORRAT} \leq 2$ ), precisão intermediária, e robustez (pH), conforme normas estabelecidas pelos órgãos competentes ANVISA (2003), INMETRO (2010);
- As principais vantagens do método, em relação aos já descritos na literatura, são: utilização de pequena quantidade de amostra e eletrólitos, não utilização de solventes orgânicos, baixo custo, automatização e a não necessidade de preparo e extração da amostra;
- A partir dos resultados obtidos a metodologia proposta e validada para quantificação do teor de açúcar livre será empregada na avaliação e estabelecimento do tempo de estocagem dos lotes da vacina conjugada. Esta metodologia também será utilizada no controle de qualidade do lote de conjugado que será submetido aos estudos clínicos de Fase III e no controle de rotina da vacina conjugada.

## 7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução N°899 de 29 de maio de 2003.

----- **Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Resolução – Rdc N° 17 de 16 De Abril de 2010

Agilent Technologies. **CE Primer - High Performance Capillary Electrophoresis**, 2009

Ahmad H, Chapnick EK. **Conjugated polysaccharide vaccines**. Infect Dis Clin North Am. Mar;13(1):113-33, 1999

Al-Mazriou Y, Khalil M, Bravo C et al. **Meningococcal conjugate vs meningococcal polysaccharide vaccine in Saudi Arabian adolescents previously vaccinated with multiple doses of meningococcal polysaccharide vaccine**. Abstract O002. 10<sup>th</sup> Meeting of the European Monitoring Group for meningococci (EMGM), Manchester, UK, 2009.

Avery OT, Goebel WF. **Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. II. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins**. J Exp Med, 50: 533-550, 1929.

Bastos RC, Carvalho JM, Silveira IAFB, Jacob SC, Leandro KC. **Determination of hydrazine in a meningococcal C conjugate vaccine intermediary product**. Vaccine 28: 5648–51, 2010.

Bastos RC. **Síntese, Purificação e Caracterização Físico-Química do Conjugado de Polissacarídeo Meningocócico C com Anatoxina Tetânica**. [Tese] Mestrado Profissional de Tecnologia de Imunobiológicos, Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 2005.

Beuvery EC, Delft RW, Miedema F, Kanhai V, Nagel J. **Immunological evaluation of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in mice**. Infect. Immun., 41: 609-617, 1983.

Bier M. **Electrophoresis - Theory, Methods and Application**. Academic Press Inc, 1959.

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

Bröker M, Veitch K. **Quadrivalent meningococcal vaccines: hyporesponsiveness as an important consideration when choosing between the use of conjugate vaccine or polysaccharide vaccine.** *Travel Med Infect Dis*, 8(1): 47-50, 2010.

Brown MB, Forsythe AB. **Robust test for the equality of variances.** *J Am Stat Assoc*, 69: 364-367, 1974.

Camilleri P. **Capillary Electrophoresis. Theory and Practice.** Second Edition. CRC Press. 1995.

Carmenate T, Guirola M, Alvarez A, Canaán L, González S, Caballero E, et al. **Memory immune response generated in *Cercopithecusaethiops* against meningococcal polysaccharide serogroup C conjugate vaccine.** *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43: 133-140, 2005.

Chu C, Schneerson R, Robbins JB & Rastogi SC. **Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates.** *Infect Immunity*, 40:245-56, 1983.

Connolly M, Noah N. **Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6.** *Epidemiol Infect*, 122: 41-49, 1999.

Costantino P, Viti S, Podda A, Velmonte MA, Nencioni L; Rappuoli R. **Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C.** *Vaccine*, 10: 691-698, 1992.

Cuello M, Cabrera O, Martinez I, Del Campo JM, Parajón E, Sotolongo F et al. **Mucosal immune responses to meningococcal C polysaccharide-protein conjugate in mice.** *Vaccine*, 24 (2): 72-3, 2006.

Cuervo MLC, Pérez LR, Oviedo M, Costa L, Perdomo V. **Relations among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine.** *Vaccine*, 2007.

Dagan R, Eskola J, Leclerc C, Leroy O. **Reduced response to multiple vaccines sharing common protein epitopes that are administered simultaneously to infants.** *Infect Immun*, 66(5): 2093-8, 1998.

De Voe IW. **The meningococcus and mechanisms of pathogenicity.** *Microbiol. Rev.*,46: 162-190, 1992.

Díez-Domingo J, Cantarino, MVP, Torrentí JMB, Sansano MIL, Rosich AJ, Merino A H, et al. **A Randomized, Multicenter, Open-Label Clinical Trial to Assess the Immunogenicity of a Meningococcal C Vaccine Booster Dose Administered to Children Aged 14 to 18 Months.** *Ped Infect Dis J*, 29 (2): 148-152, 2010.

DiFabio JL. **Polisacáridos capsulares como vacunas antibacterianas.** *Adel Microbiol Enf Infecc*, 7: 1-18, 1988.

Donaldson L, Moores Y, Howe J. **Introduction of immunization against group C meningococcal infection.** London: Department of Health, Report no. PL/CMO/99/2, 1999.

Draper NR, Smith H. **Applied regression analysis.** 3ed. Wiley. 1998.

Durbin J, Watson GS. **Testing for serial correlation in least squares regression ii.** *Biometrika*, v. 38: 159-178, 1951.

Farmacopéia Européia 5.0. **Haemophilus type B Conjugate Vaccine.** 01:1219, 2005.

Fleck F. **WHO and MSF appeal for funds for meningitis vaccine.** *Brit Med J*, 372:769 ,2003.

Frasch CE. **Meningococcal vaccines: Past, Present and Future.** *Meningococcal Disease.* Cartwright, L. Chichester, John Wiley & Sons, 1995.

Goldblatt D. **Conjugate vaccines.** *Clin Exp Immunol*, 119: 1–3, 2000.

Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS. **Human immunity to the meningococcus. III- Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides.** *J Exp Med*, 129: 1349-1365, 1969.

Granoff DM, Gupta RK, Belshe RB; Anderson EL. **Induction of immunologic refractoriness in adults, by meningococcal C polysaccharide vaccination.** *J Infect Dis*, 178: 870-4, 1998.

Granoff DM, Pollard AJ. **Reconsideration of the use of meningococcal polysaccharide vaccine.** *Pediatr Infect Dis J*, 26(8):716-22, 2007.

Hermanson GT. **Bioconjugate Techniques.** California: Academic Press, 1996.

Herzemberg LA, Tokuhisa T. **Epitope-specific regulation. Carrier-specific induction of suppression for IgG anti-hapten antibody responses.** *J Exp Med*, 155(6):1730-40, 1982.

Horwitz W. **Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies.** *Pure Appl Chem*, .67: 331-343, 1995.

Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Indústria (INMETRO) **Orientação Sobre**

**Validação de Métodos Analíticos.** DOQ-CGCRE-008. Revisão 03 – FEV/2010

Jacobs BL, Langland JO, Kibler KV, Denzler KL, White SD, Holechek SA, Wong S, Huynh T, Baskin CR. **Vaccinia virus vaccines: Past, present and future.** Antiviral Res, 2009

Jennings HJ, Lugowski C. **Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates.** J Immunol, 127:1011–18, 1981.

Jessouroun E, Silveira IAFB, Bastos RC, Frasch CE, Lee CH. **Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines.** International Publication WO 2005/037320; 2005.

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

Jokhdar H, Borrow R, Sultan A, Adi M, Riley C, Fuller E, Baxter D. **Immunologic hyporesponsiveness to serogroup C but not serogroup A following repeated meningococcal A/C polysaccharide vaccination in Saudi Arabia.** Clin Diagn Lab Immunol, 11: 83-8, 2003.

Jones C, Crane DT, Lemercinier B, Bolgiano B, Yost SE. **Physicochemical studies of the structure and stability of polysaccharide-protein conjugate vaccines.** Dev Biol Stand Basel Karger, 87: 143-151, 1996.

Jones C. **Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria.** An. Acad. Bras. Cienc, 77(2): 293-324, 2005

Joshi VS, Bajaj IB, Survase AS, Singhal RS, Kennedy JF. **Meningococcal polysaccharide vaccines: a review.** Carbohydrate Polymers, 75: 553-65, 2009.

Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wrobel K, B'Hymer C, Caruso JA. **Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis.** J Chromatogr A, 975(2):245-66, 2002.

Keyserling H, Koranyi K, Papa T, Bybel M, Ryall R. **Persistence of immune response and duration of memory from a meningococcal (groups A, C, Y, W135) polysaccharide diphtheriae toxoid conjugate vaccine (MCV-4).** Pediatric. Academic Societies. Pediatric Res., Abstract 75013, 2005.

Kim JS, Laskowich ER, Arumugham RG, Kaiser RE, MacMichael GJ. **Determination of saccharide content in pneumococcal polysaccharides and conjugate vaccines by GC-MSD.** Analytical Biochemistry, 2005

Kuhn & Hoffstetter-Kuhn. **Capillary Electrophoresis. Theory and Practice,** 1993.

LaForce FM, Ravenscroft N, Djingarey M, Viviani S. **Epidemic meningitis due to Group A *Neisseria meningitidis* in the African meningitis belt: A persistent problem with an imminent solution.** *Vaccine*, 24(27-2):13–19, 2009.

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

Lamb DH, Lei QP, Hakim N, Rizzo S, Cash P. **Determination of meningococcal polysaccharides by capillary zone electrophoresis.** *Anal Biochem* Mar 15;338(2):263-9, 2005

Landers JP. **Handbook of Capillary Electrophoresis.** Second Edition. CRC Press. 1996.

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

Lee CH, Kuo WC, Beri S, Kapre S, Joshi JS, Bouveret N, LaForce FM, Frasch CE. **Preparation and characterization of an immunogenic meningococcal group A conjugate vaccine for use in Africa.** *Vaccine*, 27(5):726-32, 2009.

Lees A, Sen G, Lopezacosta A. **Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminoxy reagents and oxime chemistry.** *Vaccine*, 24: 716-729, 2006.

Lei QP, Shannon AG, Heller RK, Lamb DH. **Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines.** *Dev Biol Basel*, Karger, 2000.

Lemercinier X; Jones C; Corbel MJ; Post SE. **Analytical procedures used in the control of bacterial glycoconjugate vaccines.** *Pharm Sci*, 3: 19-23, 1997.

Levene H. **Robust Tests for Equality of Variances, in Contributions to Probability and Statistics.** ed. I. Olkin, Palo Alto, CA: Stanford Univ. Press, 1960

Lindberg AA. **Glycoprotein conjugate vaccines.** *Vaccine*, 17: 28-36, 1999.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farral AL, Randall RH. **Protein measurement with Folin phenol reagent.** *J Biol Chem*, 193: 165, 1951;.

Makwana N, Riordan FA. **Bacterial meningitis: the impact of vaccination.** *CNS Drugs*, 21(5):355-66, 2007

Marchant CD, Miller JM, Marshall GS, Blatter M, Aris E, Fiedland LR, Boutriau D. **Randomized trial to assess immunogenicity and safety of *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis***

**serogroups C and Y-tetanus toxoid conjugate vaccine in infants.** *Pediatr Infect Dis J*, 29(1):48-52, 2010.

MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Williams D, Pais L, Carlone G, Moxon R & Greenwood B. **Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambian children following repeated immunization during early childhood.** *Vaccine*, 17: 3086-93, 1999.

Makwana N, Riordan FA. **Bacterial meningitis: the impact of vaccination.** *CNS Drugs*, 21:355–366, 2007.

MVP - Meningitis Vaccine Project. Acessado em 11 de abril de 2011. <http://www.meningvax.org/index.php>

Molesworth AM, Thomson MC, Connor SJ, Cresswell MP, Morse AP, Shears P, Hart CA, Cuevas LE. **Where is the meningitis belt? Defining an area at risk of epidemic meningitis in Africa.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(3):242-9, 2002

Menomune. Sanofi Pasteur. – **A/C/Y/W-135 (meningococcal polysaccharide vaccine groups A,C,Y and W-135 combined).** Swiftwater, PA, 2005.

Mutonga DM, Pimentel G, Muindi J, Nzioka C, Mutiso J, Klena JD, et al. **Epidemiology and risk factors for serogroup X meningococcal meningitis during an outbreak in western Kenya, 2005-2006.** *Am J Trop Med Hyg*, 80(4): 619-24, 2009.

Nathan N, Rose AM, Legros D, Tiendrebeogo SR, Bachy C, Bjørnløw E, Firmenich P, Guerin PJ, Caugant DA. **Meningitis serogroup W135 outbreak, Burkina Faso.** *Emerg Infect Dis*, 13(6):920-3, 2002.

Nogueira DR; Sangoi MS; Silva LM; Todeschini V; Dalmora SL. **Determination of rufatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method.** *J Separation Science*, 31:3098-3105, 2008.

Oosterhuis-Kafeja F, Beutels P, Van Damme P. **Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine (1998-2006).** *Vaccine*, 25(12): 2194-212, 2007.

Pawlowski A, Källenius G, Svenson SB. **Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies.** *Vaccine*, 18: 1873-1885, 2000.

Peeters CCAM, Tenbergen-Meekes AM, Poolman JT, Beurret M, Zegers BJM, Rijkers GT. **Effect of carrier priming on immunogenicity of Saccharide-protein conjugate vaccines.** *Infect Immun*, 59(10):3504-10, 1991.

Plans P. **Cost-effectiveness of 23-valent antipneumococcal vaccination in Catalonia (Spain).** *Gaceta*

Sanitaria; SESPAS 2002.

Plumb JE, Yost SE. **Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines.** *Vaccine*, 14: 399-404, 1996.

Pöllabauer EM, Petermann R, Ehrlich HJ. **The influence of carrier protein on the immunogenicity of simultaneously administered conjugate vaccines in infants.** *Vaccine*: 27: 1674-79, 2009.

Poolman JT, Van Der Ley PA, Tommassen J. **Surface structures and secreted products of meningococci.** *Meningococcal Disease*. Cartwright, L. Chichester, John Wiley & Sons, 21-34, 1995.

Renjifo X, Wolf S, Pastoret PP, Bazin H, Urbain J, Leo O, et al. **Carrier-induced hapten-specific suppression: a problem of antigen presentation.** *J Immunol*, 161(2):702-6, 1998.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. **Validação Em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos** *Quim. Nova*, 27(5): 771-780, 2004

Richmond P, Kaczmarek E, Borrow R, Findlow J, Clark S, McCann R, Hill J, Barker M. & Miller E. **Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine.** *J. Infect. Dis*, 181: 761-764, 2000.

Rodrigues FS. **Estudo de otimização dos processos de conjugação e controle do polissacarídeo de *N. meningitidis* grupo C à anatoxina tetânica.** [Tese] Mestrado Profissional de Tecnologia de Imunobiológicos, Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009

Roitt I. **Essential immunology.** Ninth edition. Oxford BLACKwell Scientific, 1997.

Ryan TA, Joiner BL. **Normal probability plots and tests for normality.** The State College: Pennsylvania State University, 1976.

Saltão R, Veiga F. **Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(1), 2001

Schnerson R, Barrera O, Sutton A, Robbins JB. **Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates.** *J Exp Med*, 152: 361-376, 1980.

Schwartz B, Moore PS, Broome CV. **Global epidemiology of meningococcal disease.** *Clin. Microbiol*, 2:118-124, 1989.

Sharip A, Sorvillo F, Redelings MD, Mascola L, Wise M, Nguyen DM. **Population-based analysis of**



**meningococcal disease mortality in the United States: 1990-2002.** *Pediatr Infect Dis J*, 25(3):191-4, 2006

Silveira IAFB, Bastos RC, Neto MS, Laranjeira AP, Assis EF, et al. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** *Vaccine*, 25:7261-70, 2007.

Silveira, IAFB. **Obtenção, caracterização físico-química e avaliação imunológica de vacinas conjugadas de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com toxoide tetânico.** [Tese], Instituto de Microbiologia / IMPPG, UFRJ, Rio de Janeiro 2007.

Sinan/CVE. [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa81\\_vacmeningoc.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa81_vacmeningoc.htm). Acessado em 20 de março de 2011.

SIREVA II Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II, 2009: **datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores.** Washington, D.C.: OPS, 2010

Souza SVC. **Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Belo Horizonte-MG, 2007

Svennerholm L. **Quantitative estimation of sialic acid. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method.** *Biochim Biophys Acta*, 241: 604, 1957.

Tavares, MFM. **Eletroforese capilar: conceitos básicos.** *Química Nova*, 19: 176-181, 1996.

----- **Mecanismos de separação em eletroforese capilar.** *Química nova*, 20: 493-518, 1997.

Tejedor JC, Moro M, Ruiz-Contreras J, Castro J, Gómez-Campderá JA, Navarro ML, et al. **Immunogenicity and reactogenicity of primary immunization with a hexavalente diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatites B-inactivated polio-*Haemophilus influenzae* type B vaccine coadministered with two doses of meningococcal C-tetanus toxoide conjugate vaccine.** *Pediatr Infect Des J*, 25(8): 13-20, 2006.

Tiselius A. *Trans. Faraday Soc.* **Electrophoresis of serum globulin.** *Biochem. J.* 31:313-317 1937.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis.** *Pure Appl. Chem*, 74: 835-55, 2002.

Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. **Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis.** N Engl J Med, 352(9):950, 2005.

Von Hunolstein C, Parisi L, Recchia S. **A routine high-performance size exclusion chromatography to determine molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines.** Vaccine, 17: 118-125, 1999.

Wang JY, Chang AHC, Guttormsen HK, Rosas AL, Kasper DL. **Construction of designer glycoconjugate vaccines with size-specific oligosaccharide antigens and site-controlled coupling.** Vaccine, 21: 1112-7, 2003.

World Health Organization. **Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine.** Technical report series. Geneva: World Health Organization. 658: 29, 1981.

----- **Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines.** WHO Technical report series, 1990.

----- **Control of epidemic meningococcal diseases: WHO practical guidelines.** Lyon, France: Edition Foundation Marcel Merieux, 1995.

----- **WHO Technical report series. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine.** WHO technical report series 2000.

----- **WHO Technical report series. Recommendations for the production and control of meningococcal group C conjugate vaccines.** WHO technical report Series 2004.

Wuorimaa T, Dagan R, Vakevainen M, Bailleux F, Haikala R, Yaich M et al. **Avidity and subclasses of IgG after immunization of infant with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant.** J Infect Dis, 184: 1211-15, 2001.