

B17 Determinação de aminoácidos usados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante por eletroforese capilar com detecção por uv sem derivatização

Izabel Cristina de Souza Crespo¹, Annibal Duarte Pereira Netto², Flávia Ferreira de Carvalho Marques²

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² Universidade Federal Fluminense – UFF

Introdução: Eritropoetina é uma glicoproteína com aproximadamente 34 kDa e uma sequência polipeptídica com 166 aminoácidos. Sintetizada nos rins, funciona como estimulador da eritropoese, provocando a proliferação e a diferenciação de células eritróides na medula óssea. Obtida pela tecnologia de DNA recombinante, é produzida em células superiores, onde o gene da eritropoetina foi transfetado. Contém uma sequência de aminoácidos idêntica à eritropoetina natural. Proteínas como a eritropoetina não apresentam boa solubilidade em água por serem moléculas grandes. A albumina de soro humano é usada nos processos de formulação como solvente estabilizante, mas o seu uso está sendo desencorajado pelas autoridades regulatórias. Aminoácidos como glicina, alanina e ácido glutâmico são usados por sua compatibilidade com a estrutura macromolecular e funcional das células, não interferindo nas atividades enzimáticas ou estrutura funcional das proteínas e aumentando sua estabilidade. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados é fundamental para a determinação destes aminoácidos. A eletroforese capilar (EC) tem se tornado importante técnica em análise biofarmacêutica. Em geral, a derivatização dos aminoácidos é realizada antes da separação por EC, a fim de melhorar a sensibilidade para detecção em UV ou fluorescência, aumentando o tempo de análise e gerando produtos cuja estabilidade depende de condições experimentais como pH e temperatura.

Objetivo: Desenvolver metodologia analítica por eletroforese capilar com detecção por UV, sem derivatização química, para determinação dos aminoácidos (ácido glutâmico, glicina, alanina) utilizados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante.

Metodologia: Um equipamento de EC (CE7100, Agilent) com detector UV/Vis de arranjo de diodos foi empregado. O método de Eletroforese Capilar de Zona (CZE) foi aplicado e separações realizadas usando capilar de sílica fundida com comprimento total de 55 cm (46,5 cm efetivo) e diâmetro interno de 50 µm. Introdução hidrodinâmica das soluções padrões e amostras a 50 mbar por 15s, potencial -25kV, temperatura 15 °C e detecção direta em 220 nm foram utilizados. O eletrólito de trabalho foi tampão fosfato 30 mmol L⁻¹ (pH 11,5), contendo CTAB 0,6 mmol L⁻¹ e metanol 10% v/v.

Resultados: O método se mostrou linear na faixa de 50 a 2500 mg L⁻¹. Valores adequados de precisão foram alcançados e os limites de quantificação foram 19,6, 20,4 e 19,5 mg L⁻¹ para ácido glutâmico, glicina e alanina, respectivamente. A viabilidade do método foi estudada através de testes de recuperação (recuperação média = 97,4%). Não houve necessidade de derivatização química e tratamento prévio da amostra. Tempo de migração menor que 5 min foi obtido para a separação dos três analitos.

Conclusão: Os resultados obtidos mostraram um conjunto de condições que possibilitaram o uso de EC para determinação simultânea de ácido glutâmico, glicina, alanina utilizados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante, sem necessidade de derivatização química e tratamento da amostra.

Palavras-Chave: Aminoácidos, Excipientes, Eletroforese Capilar