

V13 Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ácido siálico no polissacarídeo meningocócico C por cromatografia iônica

Luiz Claudio Ferreira Pimentel¹, Magda Majores¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: A cromatografia por troca aniônica em pH elevado acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) é uma técnica cromatográfica, que pode ser aplicada à análise de carboidratos. A utilização de pH muito básico promove a dissociação de carboidratos hidroxílicos, convertendo-os de espécies neutras em aniônicas. Assim como outras técnicas cromatográficas, a sua quantificação pode ser feita por padronização interna, externa ou fortificação. O PSC, polissacarídeo meningocócico sorogrupo C é constituído de unidades repetidas do ácido siálico conhecido por ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac). Este polissacarídeo é utilizado nas formulações da vacina meningocócica C, AC e ACW, sendo todas produzidas por Bio- Manguinhos.

Objetivo: Desenvolver uma metodologia alternativa para a quantificação de ácido siálico no polissacarídeo Meningocócico sorogrupo C por HPAEC-PAD.

Metodologia: A etapa inicial do desenvolvimento do método consistiu no estudo da melhor condição de hidrólise do polissacarídeo em questão, devido à suscetibilidade do ácido siálico liberado em meio ácido. Esta condição foi alcançada com ácido clorídrico 1M por 30 minutos a 80°C e, a fim neutralizar o ácido clorídrico utilizado, houve uma posterior adição quantitativa de hidróxido de sódio 1M. As condições cromatográficas foram otimizadas com a utilização de uma coluna carboPac PA10, fase móvel com composição de 100mM NaOH/NaOAc 100mM em modo isocrático, detetor de ouro e a utilização de uma *waveform* para ácidos siálicos (triple potential) sugerida pelo fabricante. O desenvolvimento do método resultou em uma análise de 10 minutos por injeção com economia de padrão e menores limites de quantificação. Os resultados foram confrontados com o método atual por espectrofotometria (Svennerholm) cujo princípio se baseia na hidrólise do polissacarídeo com liberação e conversão do ácido siálico para reação com cobre (II) e resorcinol, formando um composto colorido após aquecimento, que, após ser extraído com solvente orgânico, é medido espectrofotometricamente.

Resultados: O método desenvolvido foi validado e encontra-se de acordo com a RE nº899 de 2003, da ANVISA. Foram analisados cinco lotes diferentes de PSC através das duas metodologias e o teste ANOVA demonstrou não haver diferenças significativas entre os

resultados obtidos pelos dois métodos ($F_{cal} = 0,64 < F_{crit} = 5,32$) com 95% de confiança.

Conclusão: De acordo com os resultados obtidos na validação e na comparação entre os lotes pelas duas metodologias, conclui-se que o método por HPAEC-PAD pode ser utilizado com segurança como um método alternativo ou na substituição do método espectrofotométrico. Ele é mais vantajoso por utilizar menor quantidade de padrão, ácidos inorgânicos mais diluídos, menor limite de quantificação, menor tempo de análise e por não utilizar solventes orgânicos.

Palavras-Chave: Polissacarídeo, Ácido Siálico, HPAEC-PAD