

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO CAPSULAR DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* SOROGRUPO A.

ANNA CAROLINA MACHADO MARINHO

Trabalho vencedor do Prêmio Jayme Torres 2008, na categoria "Farmacêuticos" na Área de atuação Análises Clínicas e Toxicológicas.

Avenida Monsenhor Félix, 340 bloco A, Apto. 303, Irajá – Rio de Janeiro, Tel.: (21) 3013-1660

INTRODUÇÃO

As meningites bacterianas continuam sendo um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, constituindo importante causa de morbimortalidade na infância. Em todo o mundo, sem epidemias, ocorre um milhão de casos de meningite bacteriana por ano. Estas doenças são quase sempre emergências médicas e estão associadas a elevadas taxas de mortalidade, daí a preocupação (e a publicidade) a que estão habitualmente associadas [13].

Estima-se a ocorrência de pelo menos 500 mil casos de doença meningocócica (DM) por ano no mundo, com cerca de 50 mil óbitos [13].

É uma doença de evolução rápida e com alta letalidade, que varia de 7 até 70%, causada pela *Neisseria meningitidis*. Mesmo em países com assistência médica adequada, a *meningococemia* pode ter uma letalidade de até 40% [13].

A DM foi primeiramente descrita em 1906 no Brasil. Desde então tem ocorrido esporadicamente, sendo mais freqüente nos meses frios. Em intervalos regulares, a doença aparece em ondas epidêmicas que podem durar de dois a cinco anos [13].

Entre os anos de 1945 e 1961 ocorreu a primeira epidemia, causada pelo sorogrupo A numa taxa de incidência de 25 casos por 100.000 habitantes. No início da década de 70 houve outra grande epidemia causada pelos sorogrupos A e C, com taxas de incidência de 170 casos por 100.000 habitantes em determinadas cidades do país, tendo voltado a valores endêmicos a partir de 1976 [11].

Existem 13 sorogrupos identificados de *N. meningitidis*, porém os que mais freqüentemente causam doença são o A, o B, o C, o Y e o W135 [4,12].

A cápsula polissacarídica é um fator associado à virulência, importante por conferirem aos meningococos propriedades antifagocitárias e antibacterianas. E por isso facilitam a sobrevivência das bactérias durante sua invasão na

corrente sanguínea ou do líquido cefalorraquidiano [10]. Os principais polissacarídeos capsulares meningocócicos são formados por derivados do ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico ou NANA) (Tabela 1), exceto o sorogrupo A que é formado por unidades repetidas de N-acetilmanosamina-1-fosfato, figura 1, com ligações alfa e é codificada por um cassete biossintético de quatro genes, específico para esse grupo [6].

Tabela 1. Estrutura do polissacarídeo capsular de diferentes sorogrupos [4].

Sorogrupo	Natureza Química
A	$\rightarrow 6$)- α -D-ManNAc-(1-PO ₄ \rightarrow 3 ↑ OAc
B	$\rightarrow 8$)- α -D-NeuNAc-(2 \rightarrow
C	$\rightarrow 9$)- β -D-NeuNAc (2 \rightarrow 7/8 ↑ OAc
H	$\rightarrow 4$)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-ManNAcA-(1 \rightarrow
L	$\rightarrow 3$)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3) α -D-GlcNAc1-PO ₄ \rightarrow
X	$\rightarrow 4$)- α -D-GlcNAc-1PO ₄ \rightarrow
Y	$\rightarrow 6$)- α -D-Glc (1 \rightarrow 4)- α -D-NeuNAc-(2 \rightarrow (OAc)
W135	$\rightarrow 6$)- α -D-Gal (1 \rightarrow 4)- α -D-NeuNAc-(2 \rightarrow
Z	$\rightarrow 3$)- α -D-GalNAc (1 \rightarrow 1)-glicerol-3-PO ₄ \rightarrow
29E	$\rightarrow 7$)- β -D-KDO-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-(1 \rightarrow

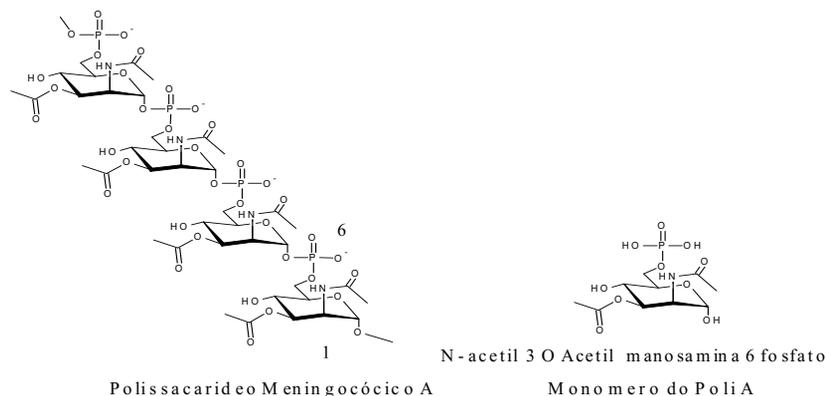


Figura 1. Estrutura molecular de Manosamina-6-fosfato (2-amino-2-deoxy-6-phosphate - β -D-Mannopyranose β -D-ManN-6-PO₃H₂) [4].

Em todos os medicamentos a padronização segundo normas de qualidade rígidas é fundamental para a garantia da eficácia e segurança no seu uso. No caso das vacinas essas normas são extremamente rígidas devido a algumas peculiaridades desse tipo de produto [16].

Vacinas contra a meningite foram às primeiras vacinas fabricadas com antígenos com uma identidade química perfeita, diferente de vacinas celulares que utilizam microorganismos inativados (p.e. coqueluche), atenuados (pólio) ou toxinas inativadas pelo formaldeído (tétano). Por esse motivo as vacinas contra meningite foram as primeiras a ter seu controle de qualidade baseado em métodos físico químicos [14].

O método de Chen está descrito na Farmacopéia Européia 5ª edição para quantificação de fósforo, porém convém avaliar sua equivalência com o método cromatográfico através de parâmetros de validação para garantir a eficácia e segurança do novo método [3].

A cromatografia de troca iônica, que geralmente é chamada de cromatografia iônica, refere-se a métodos modernos e eficientes de separação e determinação de íons com base em resinas trocadoras de íons [9].

Esta cromatografia acoplada com detecção amperométrica pulsada é um método recente para quantificação de carboidratos. A separação é baseada na interação iônica entre a carga negativa do carboidrato devido à utilização de fase móvel alcalina (pH > 12,0), com a resina aniônica [5].

Para assegurar e demonstrar que um determinado método está cientificamente coerente, sob as condições nos quais o mesmo deve ser aplicado, são descritos parâmetros (experimentos) que comprovem sua eficácia, recebendo o nome de validação [1,15].

Os parâmetros a serem avaliados dependem da finalidade da metodologia analítica a ser empregada. Tais parâmetros são: especificidade, linearidade, Intervalo, precisão, limite de quantificação, limite de detecção exatidão e robustez. [2,8].

Para estudo comparativo das duas metodologias serão avaliados somente os parâmetros de linearidade e

homocedasticidade, precisão e exatidão, demonstrando assim, se a nova metodologia garante a determinação do polissacarídeo capsular sorogrupo A com acurácia.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes, padrões e amostras.

Para análise por cromatografia foi utilizado para o preparo dos eluentes, NaOH 50% (Merck). O ácido trifluoracético (TFA) utilizado para hidrólise e o acetato de sódio para o preparo do eluente (Merck). Mini-vials (1,5mL, Ependorff) para hidrólise ácida. Vials (2,5 mL, Wheaton) para injeções automáticas no cromatógrafo. Água grau HPLC (Milli-Q). O padrão de polissacarídeo A obtido do Laboratório de Controle de Qualidade físico-químico de Bio-Manguinhos. Liofilizador para secar as amostras (Thermo).

Para a realização da análise espectrofotométrica foram utilizados ácidos perclórico 70%, sulfúrico e molibdato de amônio (Merck). Ácido ascórbico (Sigma). Água Milli-Q (Millipore). Como padrão foi utilizado fosfato dibásico de potássio (Merck). Termobloco à 250° (Frlabo), banho-maria (Callmex) e agitador (Vórtex).

Para quantificação do polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo A serão utilizadas amostras da etapa de purificação da vacina contra este sorogrupo onde foram preparadas e analisadas no laboratório de controle de processos de vacinas bacterianas em Biomanguinhos e no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, situados na Fiocruz.

2.2. Sistema espectrofotométrico

O método espectrofotométrico segue os procedimentos de Chen que consiste na determinação de fósforo onde será convertido para manosamina-6-fosfato através da relação que 2.5 μ g/mL de manosamina-6-fosfato (0.125 μ g injetado), corresponde a 0.011 μ g de fósforo utilizando espectrofotômetro Beckman DU Series 500 e cubeta em quartzo de 1 cm Brand para análise.

2.3. Sistema cromatográfico

Sistema Dionex com bomba GP 50, sistema de detecção ED 40, autosampler AS50 e software Peaknet 6.3. Colunas analíticas CarboPac PA-10 e Íon Pac AS 11 (4 x 250 mm) e pré-colunas borato trap, amino trap e ion Pac AG11 (4 x 50mm). Um potencial-quadrupolo foi aplicado utilizando os seguintes parâmetros: E1_0.1 V, t1_400 ms; E2_2.0 V, t2_20 ms; E3_0.6 V, t3_10 ms; E4_0.1 V, t4_60 ms.

2.4. Procedimento para determinação de fósforo

2.4.1. Preparo da curva de calibração e amostra

Para a determinação de fósforo foram preparadas diluições, em tubo de ensaio, a partir da solução de trabalho de fósforo 3,2µg/mL nas concentrações 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 µg/mL.

Foram utilizadas 4 (quatro) amostras da etapa de purificação da vacina, identificadas como amostra 1, amostra 2, amostra 3 e amostra 4. Para cada 100µL da amostra foi adicionado 100µL do reativo de mineralização, no qual adicionou-se 5,0mL de ácido sulfúrico concentrado e em seguida completou-se o volume com ácido perclórico 70% em balão volumétrico de 10mL. Após a adição do reativo de mineralização, os tubos de ensaio foram levados ao termobloco à 250°C por 4 horas, exceto os tubos contendo a solução de trabalho de fósforo. Deixou-se esfriar e em seguida foi acrescentado a cada tubo-amostra 3,9mL de água Milli-Q e 4,0mL do reativo de coloração nos tubos-amostra e padrão, no qual adicionou-se 24mL de água Milli-Q, 12mL de ácido sulfúrico 6N, 12mL de molibdato de amônia 2,5% e 12mL de ácido ascórbico 10% em proveta de 100mL. Homogeneizou-se. Esta solução deve ser preparada no momento de sua utilização. Agitaram-se os tubos e colocou-se o conjunto de tubos em banho-maria à 37° C por 2 horas. Após o tempo de espera, retirou-se os tubos do banho-maria

e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro Beckman DU Series 500 a 825nm.

2.5. Procedimento para determinação de manosamina -6-fosfato.

2.5.1. Preparo da curva de calibração e amostra

Para a determinação de manosamina-6- fosfato foram preparadas diluições, em balão volumétrico, da solução padrão de polissacarídeo A 200 µg/mL nas concentrações de 0,625, 1,25, 2,00, 5,00, 10,0 µg/mL.

Para estudo comparativo e avaliação dos resultados foram utilizadas as mesmas amostras para o método espectrofotométrico, anteriormente identificadas como amostra 1, amostra 2, amostra 3 e amostra 4.

Foi retirada de cada amostra, com auxílio de pipeta automática 500µL para diferentes mini-vials de 1,5mL e acrescentou 500µL de TFA 2N recentemente preparado. Os mini-vials foram colocados em termobloco a 80°C por 3 horas. Após o tempo de hidrólise, as amostras foram liofilizadas e re-suspendidas para 1mL com água Milli-Q. Os mini-vials foram agitados e transferidos para vials de 2,5mL para serem injetados no cromatógrafo utilizando como eluente hidróxido de sódio 11mM isocrático, coluna analítica Íon Pac AS 11 e Guard AG 11, fluxo 1 mL/min, volume do loop de 25µL.

RESULTADOS

3.1. Método espectrofotométrico

3.1.1. Linearidade e avaliação da homocedasticidade

Para avaliação da linearidade do método foi feita análise em triplicata de 5 concentrações diferentes da solução de trabalho de fósforo 3,2µg/mL. Foram preparadas três curvas de calibração em três dias distintos para verificação de possíveis diferenças de comportamento linear com variação do dia da análise. Os resultados estatísticos são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 2. Resultados estatísticos para linearidade.

Parâmetros	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5
Absorbância 1	0,083	0,170	0,339	0,669	1,337
Absorbância 2	0,087	0,170	0,336	0,663	1,333
Absorbância 3	0,084	0,171	0,341	0,662	1,335
Média	0,085	0,170	0,339	0,665	1,335
Desvio Padrão (DP)	0,002	0,001	0,003	0,004	0,002
DPR %	2,459	0,339	0,743	0,570	0,150
Grubbs 1	0,801	0,879	1,124	1,145	1,097
Grubbs 2	1,121	0,209	1,060	1,125	1,000
Grubbs 3	1,039	1,155	0,927	0,651	0,000
Grubbs tabelado	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155
Variança	4,333E-06	3,333E-07	6,333E-06	1,433E-05	4,000E-06
Σ Variança	2,933E-05				
Cockran (C)	0,489				

3.1.2. Precisão

Para avaliação da precisão do método foram preparadas individualmente, 4 amostras (Amostras 1, 2, 3 e 4), de acordo com o item 2.4.1, para avaliação do desvio padrão relativo

(DPR). Para repetibilidade e precisão intermediária foram feitas análises desta amostra em triplicata e em três dias diferentes. Os resultados se encontram na tabela abaixo.

Tabela 3. Resultados das amostras para avaliação da precisão do método espectrofotométrico. Os resultados foram calculados baseados na média da triplicata em dias diferentes.

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Concentração 1 ($\mu\text{g/mL}$)	50,388	35,871	25,756	15,440
Concentração 2 ($\mu\text{g/mL}$)	50,785	34,976	23,609	14,683
Concentração 3 ($\mu\text{g/mL}$)	51,916	34,724	24,259	14,893
Média	51,030	35,191	24,541	15,005
Desvio Padrão (DP)	1,183	0,895	1,241	0,855
Limite de confiança	0,683	0,517	0,716	0,494
Intervalo de Confiança 95%	$51,03 \pm 0,7$	$35,19 \pm 0,5$	$24,54 \pm 0,7$	$15,01 \pm 0,5$
DPR %	2,325	2,549	5,091	5,850
Grubbs 1	0,755	0,721	0,894	0,526
Grubbs 2	0,799	0,583	0,990	0,526
Grubbs 3	0,596	0,908	0,310	1,052

3.1.3. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada preparando a amostra 1 e padrão nas mesmas condições para precisão. Estas preparações foram analisadas individualmente. Foi

feita adição padrão na amostra dos pontos 1, 3 e 5 da curva de calibração e analisados. Foi calculado o percentual de recuperação da amostra. Os resultados encontram-se na tabela abaixo respectivamente.

Tabela 4. Resultados para amostra e padrão individualmente.

Parâmetros	Padrão 1	Padrão 3	Padrão 5	Amostra 1
Absorbância 1	0,083	0,341	1,340	0,046
Absorbância 2	0,082	0,338	1,334	0,045
Absorbância 3	0,084	0,340	1,338	0,046
Média	0,083	0,339	1,337	0,046
Desvio Padrão (DP)	0,001	0,002	0,003	0,001
DPR %	1,205	0,451	0,229	1,264

Tabela 5. Resultados após adição padrão nas amostras para avaliação do percentual de recuperação.

Parâmetros	Amostra 1 + Padrão 1	Amostra 1 + Padrão 3	Amostra 1 + Padrão 5
Absorbância 1	0,050	0,145	0,500
Absorbância 2	0,053	0,140	0,503
Absorbância 3	0,052	0,145	0,510
Média	0,052	0,143	0,504
Desvio Padrão (DP)	0,002	0,003	0,005
DPR %	0,001	0,002	0,003
Limite de confiança	0,011	0,021	0,038
Intervalo de Confiança	$0,052 \pm 0,01$	$0,143 \pm 0,02$	$0,504 \pm 0,04$
% RECUP. 1	77,519	75,325	72,307
% RECUP. 2	82,171	72,727	72,740
% RECUP. 3	80,620	75,325	73,753
Média %	80,103	74,459	72,933
Média Total %			75,832

3.2. Método cromatográfico

3.2.1. Determinação utilizando coluna CarboPac PA 10

Para obter a melhor separação cromatográfica foram avaliadas duas diferentes colunas, CarboPac PA10 e AS 11, figura 2.

3.2.2. Perda da linearidade

Ao preparar um padrão com concentração de 20,0µg/mL e injetado em triplicata, o cromatograma apresentou um perfil satisfatório com separação eficiente, figura 3, mas a linearidade do método foi perdida com adição deste ponto na curva como mostrado na figura 4 já que o coeficiente de correlação está menor que 0,999.

3.2.3. Linearidade e avaliação da homocedasticidade

A avaliação deste parâmetro foi avaliada através da análise em triplicata de 5 concentrações diferentes da solução padrão de polissacarídeo A a 200µg/mL, de acordo com a tabela 6. Foram preparadas três curvas de calibração em três dias distintos para verificação de possíveis diferenças de comportamento linear com variação do dia da análise.

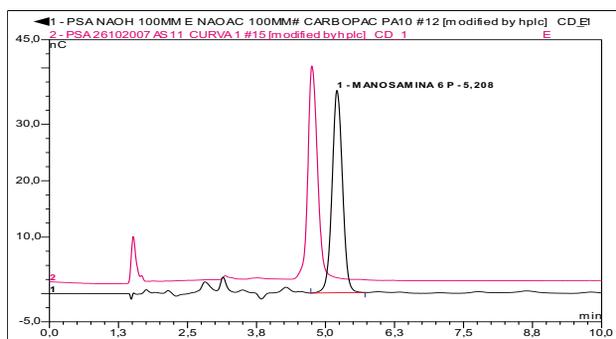


Figura 2. Cromatogramas mostrando o perfil cromatográfico utilizando diferentes colunas. Condições: Em preto utilizando como eluente NaOH 100mM e acetato de sódio 100mM, Coluna CarboPac PA10, Fluxo: 1,0mL/min, Volume de injeção: 25µL. Em rosa utilizando como eluente NaOH 11mM, Coluna AS 11 Fluxo: 1,0mL/min, Volume de injeção: 25µL. O pico de manosamina-6-fosfato é identificado.

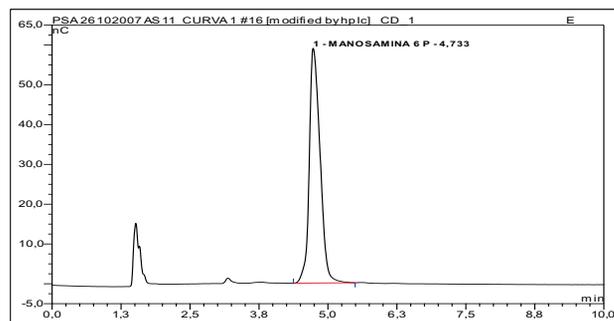


Figura 3. Cromatograma com padrão 20,0µg/mL. Condições: Eluente NaOH 11mM, Fluxo: 1,0mL/min, Volume de injeção: 25µL. Coluna AS 11 O pico de manosamina-6-fosfato é identificado.

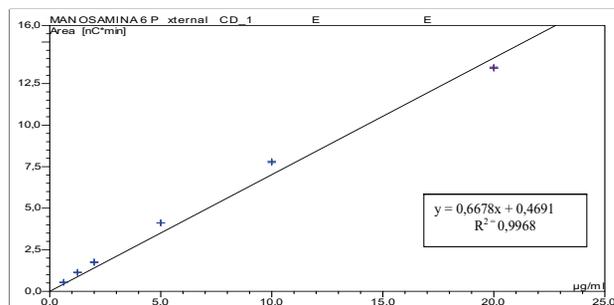


Figura 4. Curva de calibração mostrando que a linearidade do método foi perdida com adição do padrão 20,0µg/mL, último ponto na curva.

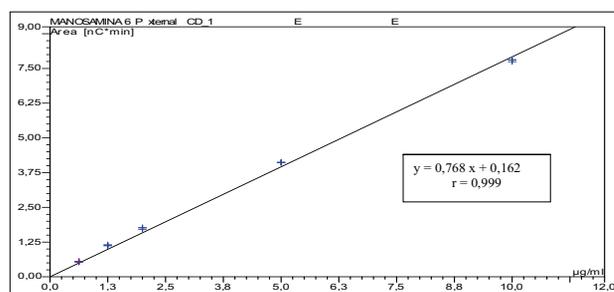


Figura 5. Curva de calibração para o método cromatográfico.

Tabela 6. Resultados estatísticos para linearidade.

Parâmetros	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5
Área 1	0,533	1,113	1,709	4,119	7,744
Área 2	0,540	1,128	1,757	4,106	7,795
Área 3	0,524	1,157	1,772	4,123	7,819
Média	0,532	1,133	1,746	4,116	7,786
Desvio Padrão (DP)	0,008	0,022	0,033	0,009	0,038
DPR %	1,507	1,975	1,885	0,216	0,492
Grubbs 1	0,083	0,879	1,124	0,338	1,097
Grubbs 2	0,956	0,209	0,334	1,125	0,235
Grubbs 3	1,039	1,088	0,790	0,788	0,862
Grubbs tabelado	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155
Variança	6,433E-05	5,003E-04	1,083E-03	7,900E-05	1,467E-03
Σ Variança	3,194E-03				
Cockran (C)	0,459				
Cockran (C) tabelado	0,684				

3.2.4 Precisão

Para o método cromatográfico foram preparadas individualmente, as mesmas amostras utilizadas para ava-

liação do método tradicional. A repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas nas mesmas condições. Os resultados se encontram na tabela 7.

Tabela 7. Resultados das amostras para avaliação da precisão do método cromatográfico. Os resultados foram calculados baseados na média da triplicata em dias diferentes.

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Concentração 1 ($\mu\text{g/mL}$)	50,565	33,945	21,281	14,289
Concentração 2 ($\mu\text{g/mL}$)	50,403	33,579	21,082	14,315
Concentração 3 ($\mu\text{g/mL}$)	50,532	33,958	21,283	14,291
Média	50,500	33,828	21,215	14,298
Desvio Padrão (DP)	0,300	0,278	0,142	0,206
Limite de confiança	0,173	0,161	0,082	0,119
Intervalo de Confiança	50,50 \pm 0,17	33,83 \pm 0,16	21,22 \pm 0,08	14,30 \pm 0,12
DPR %	0,594	0,823	0,668	1,427
Grubbs 1	0,440	0,818	0,700	0,685
Grubbs 2	0,911	0,876	0,900	0,730
Grubbs 3	0,905	0,501	0,591	0,797

3.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada preparando a amostra 1 e padrão nas mesmas condições para precisão. Estas preparações foram analisadas individualmente.

Foi feita adição padrão na amostra dos pontos 1, 3 e 5 da curva de calibração e analisados. Foi calculado o percentual de recuperação da amostra. Os resultados encontram-se na tabela abaixo respectivamente.

Tabela 8. Resultados para amostra e padrão individualmente.

Parâmetros	Área Padrão 1 (P1)	Área Padrão 3 (P3)	Área Padrão (P5)	Amostra
Área 1 (nC * min)	0,533	1,709	7,744	2,605
Área 2 (nC * min)	0,540	1,757	7,795	2,404
Área 3 (nC * min)	0,524	1,772	7,819	2,511
Média	0,532	1,746	7,786	2,507
Desvio Padrão (DP)	0,008	0,033	0,038	0,101
DPR %	1,508	1,885	0,492	4,012

Tabela 9. Resultados após adição padrão nas amostras para avaliação do percentual de recuperação.

Parâmetros	Amostra 1 + P1	Amostra 1 + P3	Amostra 1 + P5
Área 1 (nC * min)	1,491	2,197	5,000
Área 2 (nC * min)	1,448	2,157	5,019
Área 3 (nC * min)	1,486	2,085	5,057
Média	1,475	2,146	5,026
Desvio Padrão (DP)	0,024	0,057	0,029
DPR %	0,014	0,033	0,017
Limite de confiança	0,173	0,419	0,214
Intervalo de Confiança	1,475 \pm 0,17	2,146 \pm 0,42	5,026 \pm 0,21
% RECUP. 1	98,098	103,334	97,159
% RECUP. 2	95,275	101,448	97,521
% RECUP. 3	97,808	98,034	98,269
Média %	97,060	100,939	97,650
Média Total %			98,550

3.2.6 Seletividade

Para a avaliação da seletividade foi utilizada uma preparação do polissacarídeo retirado da etapa de purificação denominada Amostra 5, para avaliar o quanto o método é capaz de diferenciar a manosamina-6-fosfato dos demais componentes da matriz.

Como objetivo de verificar a relação existente entre a seletividade e a concentração de manosamina-6-fosfato foram preparadas 3 diferentes diluições e para cada diluição foram feitas 3 injeções no cromatógrafo. Esta relação é demonstrada na figura abaixo.

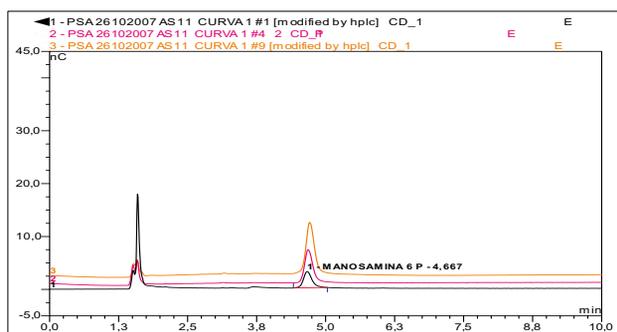


Figura 10. Cromatograma mostrando a relação existente entre a seletividade e a concentração de manosamina-6-fosfato. Em preto corresponde a uma concentração de 0,625 µg/mL de manosamina-6-fosfato. Em rosa de 1,25 µg/mL e em laranja de 5,00 µg/mL.

DISCUSSÃO

4.1. Método espectrofotométrico

4.1.1. Linearidade e avaliação da homocedasticidade

Na tabela 2 se encontra a média das absorvâncias em dias diferentes, não observando valor aberrante para este parâmetro. O método demonstrou ser homocedástico, pois foi encontrado valor de Cockran menor que o tabelado. Sendo assim, a curva de calibração pode ser calculada pelo método dos mínimos quadrados.

Após a construção da curva de calibração foi observado que o coeficiente de correlação (r) foi de 0,9946, possuindo uma variação maior que 0,001, não sendo satisfatório para linearidade.

De acordo com a tabela 3 pode-se afirmar que o DPR não foi satisfatório para as amostras 3 e 4, pois o valor para o desvio padrão relativo (DPR) não deve passar de 5%. E que não se observou nenhum valor aberrante, pois os resultados de Grubbs foram menores que o tabelado (1,155) para $n=3$, número de replicatas em cada amostra.

O percentual de recuperação não se encontra dentro do faixa aceitável de 95-105%, tabela 5, para os resultados individuais e de 98-102% para a média dos resultados, demonstrando que o método é pouco exato. Esta baixa recuperação pode ser explicada devido às dificuldades du-

rante a análise como homogeneidade da temperatura nas cavidades do termobloco.

A seletividade do método espectrofotométrico não é aplicada já que é uma metodologia tradicional preconizada pela Organização Mundial de Saúde e Farmacopéia 5ª edição.

4.2. Método cromatográfico

Foi utilizada a coluna CarboPac PA10, coluna tradicionalmente usada para a separação de açúcares neutros. A coluna AS11 é utilizada tradicionalmente para a separação de ânions inorgânicos. O pKa da manosamina fosfato é próximo ao do ácido fosfórico, possibilitando o uso dessa coluna. Em conjunto com a coluna analítica CarboPac 10 foram utilizadas pré-colunas borato trap e amino trap, como eluente isocrático acetato de sódio 100mM e NaOH 100mM.

Obteve-se um perfil cromatográfico não satisfatório, pois há detecção de interferentes que com a coluna analítica AS 11, pré-coluna ion Pac AG11 e eluente isocrático NaOH 11mM isto não é mostrado, designando esta coluna para a melhor separação cromatográfica para manosamina-6-fosfato, Figura 07.

Após a escolha da coluna AS 11 foi estabelecido o intervalo de concentração para avaliação da linearidade de 0,625 µg/mL a 10,0 µg/mL de manosamina-6-fosfato, já que a linearidade do método foi perdida com a adição do ponto na concentração de 20,0 µg/mL apresentando coeficiente de correlação menor que 0,999, figura 4.

Na tabela 6, encontra-se a média das áreas em dias diferentes e os parâmetros avaliados mostrando que o método é homocedástico. A curva de calibração foi calculada pelo método dos mínimos quadrados pois foi encontrado valor de Cockran menor que o tabelado. Não se observa valor aberrante para este parâmetro. O coeficiente de correlação foi satisfatório apresentando valor de 0,999 para as três curvas de calibração.

Pode-se observar que para o parâmetro de precisão, o DPR foi satisfatório para todas as amostras. Não foi observado nenhum valor aberrante segundo o teste de Grubbs.

O percentual de recuperação encontra-se dentro do faixa aceitável de 95-105% para os resultados individuais e de 98-102% para a média dos resultados, demonstrando que o método é exato.

A seletividade de um procedimento analítico é determinada através da análise de amostras em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes da amostra

O método demonstrou ser específico para a substância em questão, pois detectou o pico de manosamina-6-fosfato sem algum interferente, em tempo de retenção compatível com o tempo encontrado para os padrões

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, ao Professor Filipe Soares, Carla Wolanski e ao Instituto BioManguinhos/Fiocruz.

CONCLUSÃO

Diante da avaliação dos resultados obtidos estatisticamente sugere-se que o método cromatográfico é o mais seguro para determinar manosamina-6-fosfato, pois os desvios padrões são menores que 5%, valor de intercepto dentro do intervalo de confiança mostrando que o mesmo trabalha apenas com erros aleatórios. O percentual de recuperação está entre 98–102% e apresentou boa seletividade, pois determinou a substância de interesse na presença de outros interferentes. Já o método espectrofotométrico, seguindo os procedimentos de Chen, apesar de recomendada pela Organização Mundial de Saúde e Farmacopéia Européia 5ª edição, não foi a melhor metodologia mais indicada para a quantificação de fósforo, em nosso laboratório, por apresentar uma série de dificuldades durante a análise. Tais elas são: Problemas na digestão das amostras devido às variações de temperatura nas cavidades do termo-bloco durante todo o tempo de 4 horas e que a mesma deveria ser constante com o passar do tempo. Para análise de rotina não seria de melhor escolha devido o tempo gasto para obter a concentração final do analito e os resultados estatísticos não foram satisfatórios em relação ao percentual de recuperação e coeficiente de correlação.

Para que a metodologia cromatográfica seja implantada realmente se faz necessário prosseguir com o estudo de validação dando continuidade nos experimentos estabelecidos pelas normas vigentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm Acesso em: 12/09/2007
2. CELS, M. C., FORA, S. G., FORN, M. P., ROCA, J. M. S., PLA, L. V. Validación de Métodos Analíticos. AEFI, Sección Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, p. 100, 1996.
3. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, Huber. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 11, p. 1756-1758, novembro 1956.
4. GOLDBLATT D., POLLARD A. J., Meningococcal Vaccines Methods and Protocols Humana Press, v.66, p. 23-44, 2001.
5. HARDY, Mark R., TOWNSEND, Reid R., LEE, Yuan C. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, v. 170, p. 54–62, 1988.
6. HARRISON, T. R., **Princípios da Medicina Interna** 16. ed. McGraw-Hill, p. 893-899, 2003.
7. HUNOLSTEIN, Christina V., PARISI, Laura, BOTTARO, Dario. Simple and rapid technique for monitoring the quality of meningococcal polysaccharides by high performance size – exclusion chromatography. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, v. 56, p.291-296, 2003.
8. ICH Q2 (R1), **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Genebra, Novembro de 2005.
9. MECHREF, Yehia, NOVONTY, Milos V., Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. *Chemicals Reviews*, Indiana, v. 102, n. 2, p. 321-369, janeiro 2002.
10. MORLEY, S.L., POLLARD A. J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine*, v. 20, p. 666-687, 2002.
11. QUADROS, Ciro A.; **Vaccines Preventing Disease Protecting Health**. Pan American Health Organization, p. 99-103, 2004.
12. RICCI S., BARDOTTI Â., D'ASCENZI S., RAVENSCROFT N. Development of a new method for the quantitative analysis of the extracellular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection. *Vaccine*. v.19, p. 1989-1997, 2001.
13. SANTOS M. L., NETTO A. R. Doença meningocócica: situação epidemiológica no Município de Manaus, Amazonas, Brasil, 1998/2002 *Caderno de Saúde Pública*, v.3, p.823-829, Rio de Janeiro 2005.
14. SÁFADI, Marco A., BARROS, Analíria P., Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. 3, p.s34-s44, 2006.
15. SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v.2, n.3, p. 12-20 junho de 1998.
16. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines**. p. 8-18, Geneva 2006.