

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA

**Ana Luiza Habigzang Siqueira**



**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA  
QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DE IMIDAZOL EM AMOSTRAS  
DE L-ASPARAGINASE**

RIO DE JANEIRO

2023

Ana Luiza Habigzang Siqueira

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO POR HPLC  
DE IMIDAZOL EM AMOSTRAS DE L-ASPARAGINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Orientador(es): Jose Angel Ramon Hernandez  
Ivaldo Itabaiana Jr.

Rio de Janeiro  
2023

## CIP - Catalogação na Publicação

S618a Siqueira, Ana Luiza Habigzang  
Avaliação de Parâmetros Analíticos para  
Quantificação por HPLC de Imidazol em Amostras de L  
asparaginase / Ana Luiza Habigzang Siqueira. -- Rio  
de Janeiro, 2023.  
53 f.

Orientador: Jose Angel Ramon Hernandez.  
Coorientador: Ivaldo Itabaiana Jr..  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de  
Química, Bacharel em Engenharia Química, 2023.

1. Parâmetros analíticos. 2. Quantificação. 3.  
Imidazol. 4. HPLC. I. Hernandez, Jose Angel Ramon,  
orient. II. Itabaiana Jr., Ivaldo, coorient. III.  
Título.

Ana Luiza Habigzang Siqueira

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO POR HPLC  
DE IMIDAZOL EM AMOSTRAS DE L-ASPARAGINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Escola de Química da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Engenheiro  
Químico.

Aprovado em 22 de dezembro de 2023.

---

Jose Angel Ramon Hernandez, D.Sc., DEB/EQ/UFRJ

---

Ivaldo Itabaiana Jr., D.Sc., DEB/EQ/UFRJ

---

Vivian María Saez Martínez, D.Sc., DQA/IQ/UFRJ

---

Douglas Guedes Ferreira, D.Sc., DEB/EQ/UFRJ

Rio de Janeiro  
2023

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Pepe e Ivaldo pela orientação. Em especial, ao Pepe por todo o ensinamento prático em cromatografia, por toda a confiança depositada no meu trabalho e por ter me ajudado diversas vezes quando o equipamento não funcionava do jeito que deveria.

A Raíssa pelas amostras fornecidas, pela troca de informações e por toda a ajuda em alguns experimentos.

Ao LECC, pelo companheirismo e por todo o aprendizado e experiência em validação analítica de produtos biológicos. Em especial, a professora Leda por salvar meus experimentos fornecendo uma válvula de injeção nova e ao Túlio por ter me ajudado com sua experiência em ÄKTA. A Renata, por todo o apoio e compreensão com meus fins de período caóticos durante o curso. A Gabi e ao Fred pelas fofocas e pela amizade que, com certeza, fizeram toda a diferença para eu chegar até aqui, viva.

Ao Nikolas, meu grande amigo, pela convivência e por ter me apoiado em todos esses últimos 5 anos de curso sem duvidar do meu potencial.

As minhas melhores amigas, Carol e Bianca, pela eterna amizade.

A minha família, em especial, minha mãe, por sempre ter priorizado meus estudos mesmo em momentos tão difíceis. Sem seu apoio nada disso teria sido possível.

A UFRJ por ter me proporcionado essa formação acadêmica com muita competência e qualidade.

## RESUMO

SIQUEIRA, Ana Luiza Habigzang. **Avaliação de Parâmetros Analíticos para Quantificação por HPLC de Imidazol em Amostras de L-Asparaginase.** Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A L-asparaginase (ASNase) é um biofármaco utilizado no tratamento para leucemia linfoide aguda (LLA) juntamente com outros quimioterápicos. Alternativas para a produção da ASNase têm sido amplamente estudadas em busca da diminuição de efeitos colaterais e aumento da eficácia do medicamento. A produção de uma ASNase recombinante de *Zymomonas mobilis* expressa pela *Escherichia coli* tem sido desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. Sua purificação inclui diversas etapas cromatográficas onde, uma delas, utiliza o imidazol como agente de eluição da proteína. Portanto, a amostra purificada de ASNase acaba contando com a presença de imidazol como uma impureza de processo. Esse imidazol restante interfere nas etapas de PEGlação, posterior a purificação e, então, torna-se necessário monitorar a quantidade de imidazol presente. O presente trabalho realiza uma validação de um método analítico para quantificação de imidazol através da técnica de HPLC em amostras de ASNase purificada. Os ensaios experimentais mostraram que o método apresenta seletividade, linearidade, precisão e exatidão no intervalo de 0,05 a 0,25 mM de imidazol. O limite de detecção e quantificação foram iguais a 0,0015 e 0,05 mM, respectivamente, e o teor de imidazol na amostra estudada foi de 3,71 µg de imidazol por 100 µg de proteína.

Palavras-chave: parâmetros analíticos; quantificação; imidazol; HPLC.

## ABSTRACT

SIQUEIRA, Ana Luiza Habigzang. SIQUEIRA, Ana Luiza Habigzang. **Evaluation of Analytical Parameters for HPLC-quantification of Imidazole in L-asparaginase samples.** Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

L-asparaginase (ASNase) is a biopharmaceutical used in the treatment of acute lymphocytic leukemia (ALL) with other chemotherapy drugs. Alternatives to produce ASNase have been widely studied in order to reduce side effects and increase its effectiveness. The production of a recombinant ASNase from *Zymomonas mobilis* expressed by *Escherichia coli* has been developed in the Bioprocesses Laboratory of the Chemical Engineering Program at COPPE/UFRJ. Its purification process includes several chromatographic steps and one of these steps uses imidazole as a protein elution agent. Therefore, the ASNase eluted at the end of purification has the presence of imidazole as a process impurity. This remaining imidazole interferes with the PEGylation steps, after purification, and it is then necessary to monitor the amount of imidazole present. In this work, an analytical method validation was developed for a HPLC-quantification of imidazole in ASNase-purified samples. Experimental tests showed that the method presents selectivity, linearity, precision, and accuracy in the 0,05 to 0,25 mM range. The limit of detection and limit of quantification were equal to 0,0015 and 0.05 mM, respectively, and the imidazole content in the studied sample was 3,71 µg of imidazole per 100 µg of protein.

Keywords: analytical parameters; quantification; imidazole; HPLC.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1.1 – Síntese da L-asparagina via L-asparagina sintase.
- Figura 2.1 – Esquema genérico de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.
- Figura 2.2 – Molécula de histidina.
- Figura 2.3 – Tecnologia *His tag* para purificação de proteínas.
- Figura 2.4 – Relação entre pH e a carga de uma proteína.
- Figura 2.5 – Representação da cromatografia por exclusão de tamanho.
- Figura 3.1 – Cromatógrafo utilizado nos procedimentos experimentais.
- Figura 4.1 – Curva padrão (1)
- Figura 4.2 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (1)
- Figura 4.3 – Regressão linear da curva padrão.
- Figura 4.4 – Curvas médias padrão e amostra fortificada.
- Figura A.1 – Curva padrão (1)
- Figura A.2 – Curva padrão (2)
- Figura A.3 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,00 mM (1)
- Figura A.4 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,00 mM (2)
- Figura A.5 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (1)
- Figura A.6 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (2)
- Figura A.7 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,10 mM (1)
- Figura A.8 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,10 mM (2)
- Figura A.9 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,15 mM (1)
- Figura A.10 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,15 mM (2)
- Figura A.11 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,20 mM (1)
- Figura A.12 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,20 mM (2)
- Figura A.13 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,25 mM (1)
- Figura A.14 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,25 mM (2)

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 – Parâmetros analíticos exigidos para cada tipo de método.

Tabela 3.1 – Construção da curva padrão.

Tabela 3.2 – Construção da curva de amostra fortificada.

Tabela 3.3 – Critérios de aceitação dos parâmetros analíticos.

Tabela 4.1 – Resultados de repetibilidade da curva padrão.

Tabela 4.2 – Resultados de repetibilidade da curva de amostra fortificada.

Tabela 4.3 – Resultados de precisão intermediária para cada curva.

Tabela 4.4 – Parâmetros da curva padrão.

Tabela 4.5 – Valores de resolução dos picos cromatográficos.

Tabela 4.6 – Parâmetros das regressões lineares.

Tabela 4.7 – Coeficientes angulares.

Tabela 4.8 – Valores de recuperação da curva de amostra fortificada.

Tabela 4.9 – Valores de limite de detecção calculados.

Tabela 4.10 – Valores de limite de detecção calculados.

Tabela B.1 – Valores das áreas dos picos de imidazol para as curvas padrão (1) e (2).

Tabela B.2 – Valores das áreas dos picos de imidazol para as curvas de amostra fortificada (1) e (2).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASN	L-asparagina
ASNase	L-asparaginase
ATP	Adenosina trifosfato
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
HCP	<i>Host cell proteins</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IEC	<i>Ion-exchange chromatography</i>
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
LD	Limite de detecção
LLA	Leucemia linfoide (ou linfoblástica) aguda
LQ	Limite de quantificação
N/A	Não aplicável
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelettrico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SQR	Substância química de referência
UV	Ultra-violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\bar{X}$	Média aritmética
$r$	Coeficiente de correlação
$r^2$	Coeficiente de determinação
$C_{amostra\ adicionada}$	Concentração de imidazol na amostra adicionada de padrão
$C_{amostra}$	Concentração de imidazol amostra sem adição de padrão
$C_{teórica}$	Concentração de imidazol teórica
$a$	Coeficiente angular
$\sigma$	Desvio padrão
$mAU$	“Mili” unidades de absorbância
$mL$	Mililitro
$min$	Minuto
$MPa$	Mega pascal
$\mu L$	Microlitro
$\mu g$	Micrograma
$nm$	Nanômetro
$L$	Litro
$NaCl$	Cloreto de sódio
$M$	Molar
$kDa$	Quilo-Dalton
$g$	Gramma
$mol$	Mol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 A L-ASPARAGINA E A L-ASPARAGINASE.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE DE ZYMONONAS MOBILIS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 PURIFICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Cromatografia .....	16
2.3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	16
2.3.1.2 Cromatografia por afinidade.....	17
2.3.1.3 Cromatografia de troca iônica .....	18
2.3.1.4 Cromatografia por exclusão de tamanho .....	20
<b>2.4 CONTROLE DE QUALIDADE .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Validação analítica.....	21
2.4.2 Parâmetros analíticos .....	21
2.4.2.1 Precisão.....	21
2.4.2.2 Linearidade .....	22
2.4.2.3 Faixa de trabalho.....	23
2.4.2.4 Seletividade.....	23
2.4.2.5 Exatidão .....	24
2.4.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação.....	24
2.4.2.7 Robustez .....	25
2.4.2.8 Parâmetros exigidos.....	25
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 EQUIPAMENTO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 AMOSTRA .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 SOLUÇÕES.....</b>	<b>28</b>
3.3.1 Fase móvel (PBS pH 8) .....	28
3.3.2 Imidazol 2 mM .....	28
<b>3.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS.....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Critérios de aceitação.....	30

<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 PRECISÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 LINEARIDADE .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 SELETIVIDADE .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 EXATIDÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 FAIXA DE TRABALHO .....</b>	<b>39</b>
<b>4.6 LIMITE DE DETECÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>
<b>APÊNDICE A – Cromatogramas das curvas padrão e curva de amostra fortificada .....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE B – Tabelas dos dados experimentais.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leucemia linfoide (ou linfoblástica) aguda (LLA) é uma forma de câncer no sistema linfático. Ela é causada pelo crescimento desordenado das células linfoblastos durante a hematopoese (SCHOLAR, 2007). Os linfoblastos rapidamente se acumulam na medula óssea, suprimindo o desenvolvimento de células sanguíneas normais e saudáveis. Como resultado, há um acúmulo de linfoblastos que não funcionam e poucas células sanguíneas maduras (ABRALE, 2023).

É comum alguém com este tipo de leucemia sentir uma perda de bem-estar devido à diminuição da produção de células sanguíneas normais na medula óssea. Os sintomas associados a isso incluem: fadiga, tontura, infecções frequentes, febre, problemas de coagulação, sangramentos, etc (ABRALE, 2023).

A LLA ocorre em pessoas de todas as faixas etárias, mas é o câncer mais comum nas crianças, representando 75% de todas as leucemias em crianças com menos de 15 anos de idade. Ela afeta frequentemente crianças entre 2 e 5 anos de idade. Na população adulta, é relativamente mais frequente nas pessoas com mais de 45 anos. Antes de existir um tratamento, a maioria das pessoas que sofria de LLA morria em até quatro meses após o diagnóstico. Atualmente, quase 80% das crianças e entre 30 e 40% dos adultos com LLA são curados (EMADI, 2022).

Um dos tratamentos disponíveis para a LLA é a administração da L-asparaginase (ASNase) junto a quimioterápicos e outros medicamentos. A ASNase é uma enzima que possui ação anti-tumoral ao impedir a sobrevivência das células leucêmicas sem prejudicar as células saudáveis. A maior parte das ASNase produzidas atualmente são isoladas da *Escherichia coli*, porém há a busca de ASNase alternativas, derivadas de outros microrganismos, com o objetivo de reduzir efeitos colaterais e aumentar a eficácia do medicamento (MÜLLER, 1998).

A ASNase estudada neste trabalho é uma enzima recombinante de *Zymomonas mobilis* expressa através de *Escherichia coli*. Sua expressão, fermentação, extração e purificação tem sido estudadas pelo Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE. Nesse contexto, dá-se a importância da implementação de um controle de qualidade durante as etapas do processo, além de um controle de qualidade do produto acabado.

Sabe-se que, para realizar uma das etapas de purificação dessa ASNase, é necessário a utilização de imidazol, um composto orgânico que auxilia na eluição da enzima pela coluna cromatográfica. Em seguida, boa parte dessa substância é retirada via cromatografia de troca iônica, porém uma análise por exclusão de tamanho posterior mostra a permanência de uma

determinada quantidade de imidazol e, portanto, ela começa a ser classificada como uma impureza de processo (GONÇALVEZ, 2019).

Ao final da purificação dessa ASNase, a enzima sofre o processo de PEGlação que consiste na sua conjugação com polietileno glicol. Este método tem o objetivo de aumentar propriedades farmacológicas e a estabilidade de proteínas (RAMON, 2021). Como a reação de PEGlação ocorre entre o polietileno glicol e os grupamentos amino da ASNase, a presença de imidazol no meio poderia interferir nessa reação uma vez que ela também contém grupamentos amino.

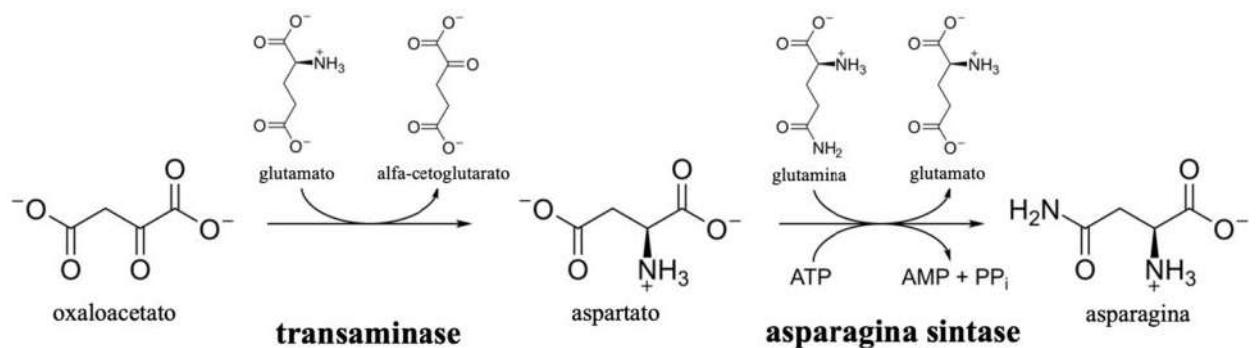
Diante disso, o estudo da quantificação dessa impureza é necessário para garantir a qualidade do lote produzido. Portanto, o objetivo geral deste trabalho é realizar uma validação de um método analítico para a quantificação do imidazol em amostras purificadas de ASNase. Pensando em uma futura aprovação da enzima para testes clínicos, a validação foi realizada seguindo regulamentações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Assim sendo, os objetivos específicos deste trabalho é atender os critérios de aceitação para todos os parâmetros analíticos (seletividade, exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, faixa de trabalho e linearidade) exigidos pela agência.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A L-ASPARAGINA E A L-ASPARAGINASE

A L-asparagina (ASN) é um aminoácido não-essencial importante para a biosíntese de proteínas e glicoproteínas. O precursor de sua biosíntese é o oxaloacetato, que reage com o L-glutamato para formar L-aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato na presença de uma enzima transaminase. O L-aspartato, por sua vez, reage com a L-glutamina para formar a ASN na presença de ATP e da enzima L-asparagina sintase (TEIXEIRA et al., 2017).

**Figura 1.1 – Síntese da L-asparagina via L-asparagina sintase.**



Fonte: Wikipedia (Adaptado).

Em certos tipos de tumores, como células leucêmicas, não é possível sintetizar a ASN pela sua deficiência na expressão da L-asparagina sintase. Dessa forma, a proliferação e a sobrevivência dessas células dependem da disponibilidade de ASN extracelular (TEIXEIRA et al., 2017). Assim, uma terapia baseada na indisponibilidade da ASN extracelular prejudicaria a biossíntese de proteínas de células tumorais, levando a sua apoptose (STARKOVA, 2018). Como as células saudáveis são capazes de sintetizar a ASN, a ausência de ASN extracelular prejudicaria majoritariamente as células tumorais. Diante disso, a enzima ASNase tornou-se um importante medicamento anti-tumoral promissor ao catalisar a hidrólise da ASN em aspartato e amônia. (MÜLLER, 1998).

Os primeiros testes clínicos foram realizados na década de 60 com a ASNase isolada de *Escherichia coli* em pacientes com LLA e linfomas não-Hodgkin. Apesar das respostas positivas obtidas com o tratamento, foram observados casos de hipersensibilidade, como reações alérgicas e redução da atividade enzimática causada por reações imunológicas. Assim, buscando uma diminuição dos efeitos adversos apresentados, foram estudadas algumas alternativas como, por exemplo, a obtenção da ASNase de outros microrganismos uma vez que se observou diferenças no tempo de meia-vida e atividade enzimática entre ASNase derivadas de diferentes microorganismos (MÜLLER, 1998). Além disso, tem se mostrado que a conjugação da ASNase com polietileno glicol aumenta o tempo de meia-vida e a estabilidade da enzima por formar grupamentos hidrofílicos em torno da proteína, aumentando a sua solubilidade e impedindo sua interação com proteases e anticorpos. (RAMON et al., 2021; MÜLLER, 1998).

Atualmente, no mundo são comercializadas majoritariamente ASNase derivadas da *Escherichia coli* sob diversos nomes como: Oncaspar®, Spectrila®, Elspar® entre outros. A exceção é o medicamento de nome comercial Erwinase® derivada da *Erwinia cysanthemi*.

## 2.2 PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE DE ZYMONONAS MOBILIS

Uma outra forma de produção da ASNase é desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ que se baseia na expressão da ASNase da bactéria *Zymomonas mobilis* pela *Escherichia coli*. Essa ASNase recombinante tem sido objeto de estudo do laboratório, onde tem sido avaliado a expressão de clones e sua produção em frascos agitados (EINSFELDT, 2014), modelagem de seu comportamento cinético e de seus fluxos metabólicos (WASHINGTON, 2016), extração e purificação (GONÇALVES, 2019) e seu controle de qualidade de processo (ABUD, 2005).

## 2.3 PURIFICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE

### 2.3.1 Cromatografia

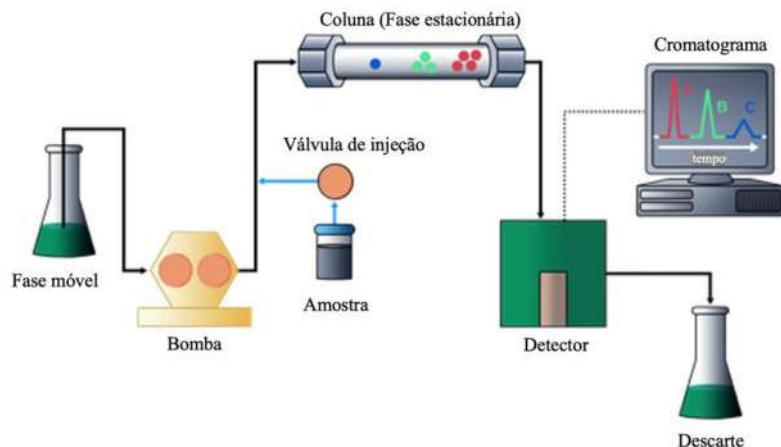
A cromatografia é essencialmente uma técnica de separação onde uma amostra é eluida por uma fase móvel através de uma fase estacionária. Durante a eluição, os componentes da amostra interagem com a fase estacionária de forma diferenciada, gerando diferenças na velocidade de eluição levando que, ao final da corrida cromatográfica, cada componente esteja separado fisicamente (COSKUN, 2016).

A cromatografia pode ser classificada quanto ao seu sistema cromatográfico, sua fase móvel, sua fase estacionária e de acordo com seu modo de separação. O tipo de cromatografia mais utilizado na área biotecnológica é a cromatografia em coluna preenchida com uma fase estacionária (matriz) sólida, eluindo a amostra em uma fase móvel líquida. Quando essa técnica é feita em um equipamento eletrônico, com utilização de bombas, válvulas de injeção e sistema de detecção dos componentes, ela é chamada de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC para *high-performance liquid chromatography*) (SHIMADZU).

#### 2.3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência genérico é ilustrado na Figura 2.1. No equipamento, a fase móvel é bombeada levando um determinado volume fixo de amostra injetada até a coluna cromatográfica. Dentro da coluna, os componentes da amostra são separados fisicamente e, ao sair da coluna, encontram um detector. Um dos detectores mais utilizados para HPLC é o detector de UV que se baseia na passagem de luz em um dado comprimento de onda pelo eluato. Se o componente separado tiver a propriedade física de absorver luz naquele comprimento de onda, um sinal eletrônico é gerado durante sua passagem pelo detector produzindo, idealmente, uma curva gaussiana. O conjunto das curvas gaussianas referente a cada componente da amostra constitui o que é chamado de cromatograma (SIQUEIRA, 2019).

**Figura 2.1 – Esquema genérico de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.**



Fonte: Labster (Adaptado).

Quando o objetivo é a purificação de uma determinada amostra, é possível coletar frações do eluato que contém o componente desejado purificado. Porém, quando se tem posse de uma solução padrão da amostra é possível também utilizar a técnica de HPLC como uma análise qualitativa e/ou quantitativa. A análise qualitativa, por sua vez, baseia-se na identificação do componente através de seu tempo de retenção e a análise quantitativa baseia-se na relação entre a concentração do componente e a sua respectiva área do pico cromatográfico, através dos princípios da Lei de Lambert-Beer (DRAWELL, 2023).

Em relação a coluna cromatográfica, ela é o que difere as técnicas cromatográficas pelo seu modo de separação. Neste sentido, as cromatografias mais utilizadas para purificação de proteínas são as por exclusão de tamanho, troca iônica e por afinidade.

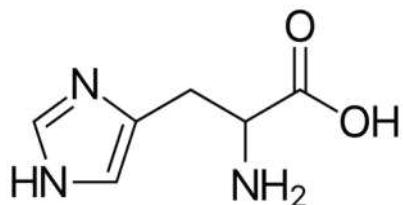
### 2.3.1.2 Cromatografia por afinidade

Quando a fase estacionária é constituída de grupamentos que promovem a interação da matriz com moléculas específicas, a técnica é chamada de cromatografia por afinidade. Um exemplo comum de cromatografia por afinidade utilizado em purificações de proteínas é a que utiliza metal imobilizado (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) para interagir com anéis de imidazol.

O imidazol é um composto orgânico, aromático, heterocíclico e está presente na molécula de histidina que, por sua vez, é um aminoácido geralmente expresso em cauda (*His tag*) acoplado a proteína de interesse. O anel de imidazol presente na histidina interage com metais de transição na matriz, retendo a proteína na coluna. Em seguida, lava-se a coluna com um tampão em baixa concentração de imidazol para eluir as impurezas como HCP (*host protein*

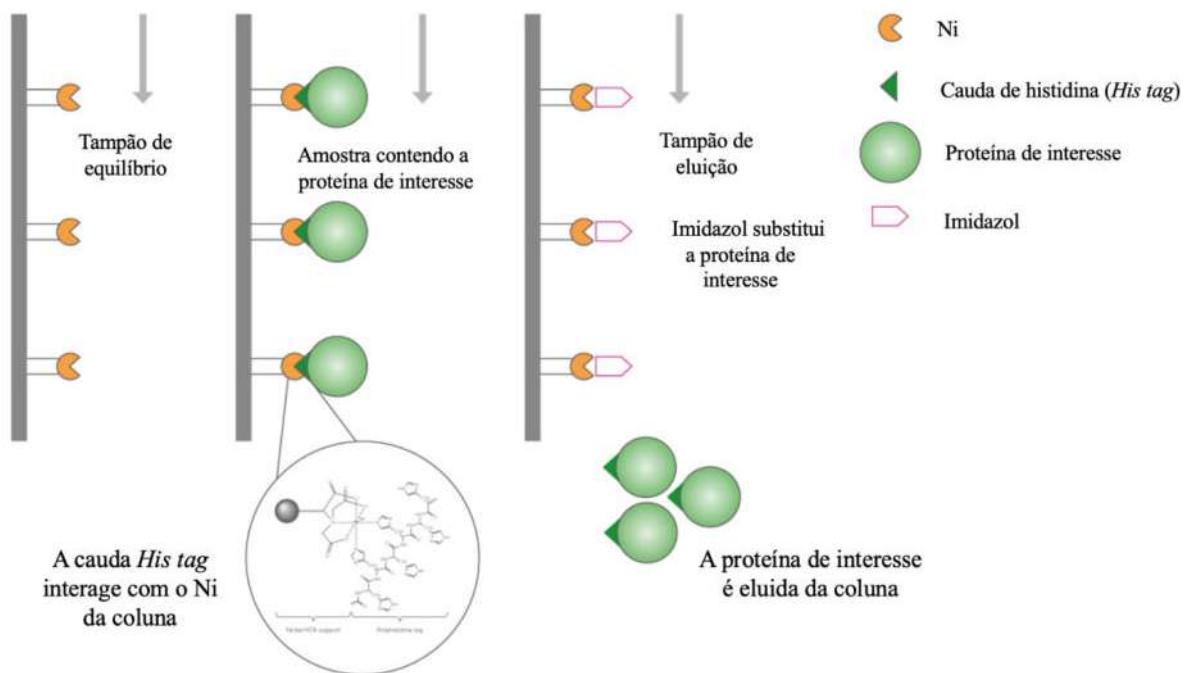
cells) e, então elue-se a proteína em tampão com alta concentração de imidazol (GONÇALVEZ, 2019).

**Figura 2.2 – Molécula de histidina.**



Fonte: Wikipédia.

**Figura 2.3 – Tecnologia *His tag* para purificação de proteínas.**



Fonte: Evitria (Adaptado).

### 2.3.1.3 Cromatografia de troca iônica

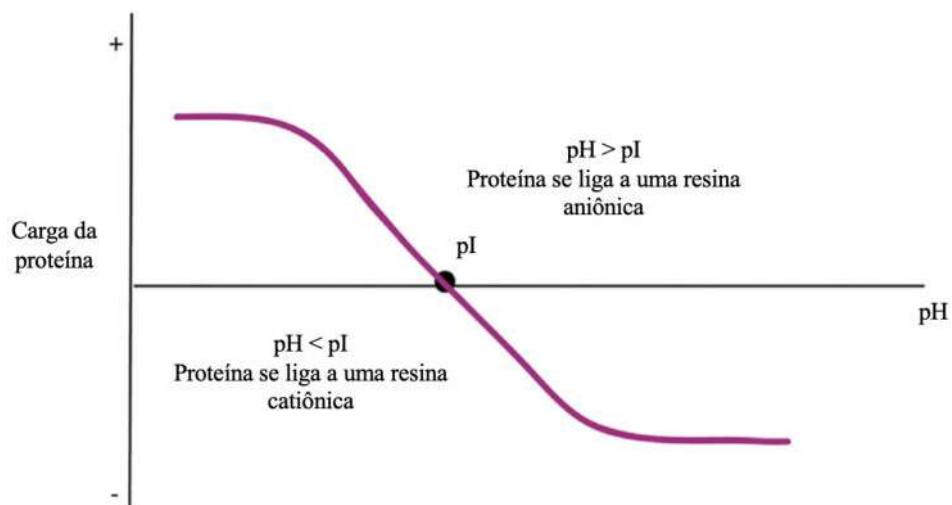
Quando a fase estacionária é constituída de grupamentos com carga, que promove a interação com componentes de carga oposta, essa técnica é chamada cromatografia de troca iônica (*ion-exchange chromatography*, IEC).

Como as proteínas são constituídas de aminoácidos com grupamentos básicos (amino) e ácidos, dependendo do pH do meio esses grupamentos podem ser protonados ou desprotonados e a proteína adquire carga positiva ou negativa, respectivamente. O valor de pH onde a proteína não possui carga é chamado de pI (ponto isoelétrico). Se o pH do meio for

menor que o  $pI$  da proteína, ela se torna positivamente carregada devido a protonação dos grupamentos amino e a coluna ideal para sua retenção é aquela constituída de uma resina negativamente carregada (resina catiônica). Se o pH do meio for maior que o  $pI$  da proteína, ela se torna negativamente carregada devido a desprotonação dos grupamentos ácidos e a coluna ideal para sua retenção é aquela constituída de uma resina positivamente carregada (resina aniônica) (DCTECH).

Uma vez que a proteína é retida na coluna, a mesma é lavada com o tampão eluindo os componentes não retidos. Em seguida, a proteína é eluida com um tampão em alta concentração salina. Os sais presentes no tampão de eluição geram um aumento na força iônica do meio, e o íon de carga oposta a resina troca de lugar com a proteína, fazendo ela ser eluida pela fase móvel (DCTECH).

**Figura 2.4 – Relação entre pH e a carga de uma proteína.**



Fonte: DUONG-LY et al., 2014. Adaptado.

Para compostos orgânicos, o ponto isoelettrico é o equivalente ao  $pKa$  e sua carga depende da mesma forma com o pH do meio: se o pH do meio for maior que o  $pKa$ , o composto é desprotonado e se torna negativamente carregada, se pH do meio for menor que o  $pKa$ , o composto é protonado e se torna positivamente carregado.

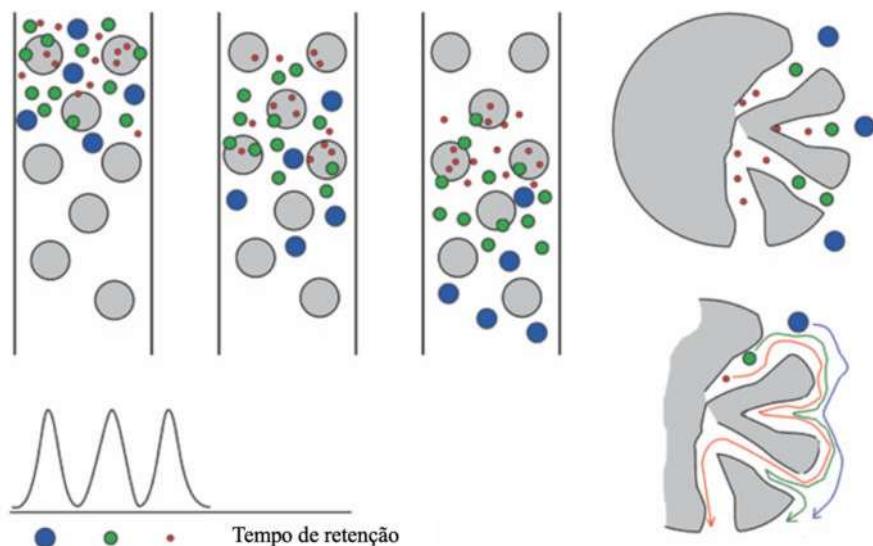
Diante disso, a cromatografia de troca iônica se mostra como uma boa solução para a separação do imidazol eluido com a proteína na cromatografia por afinidade. Como a ASNase possui um  $pI$  aproximado de 5,94, e o imidazol possui um  $pKa$  de 14,5, manter o pH do tampão de amostra e da fase móvel por volta de 8 tornará a proteína negativamente carregada e o imidazol positivamente carregado. Uma coluna com resina aniônica reteria a proteína e eluiria

o imidazol. Por fim a eluição da proteína com tampão em alta concentração salina levaria a uma amostra de proteína com menor concentração de imidazol (GONÇALVEZ, 2019).

#### 2.3.1.4 Cromatografia por exclusão de tamanho

Quando a fase estacionária é constituída de um gel poroso, que promove uma separação dos componentes por tamanho, essa técnica é chamada cromatografia por exclusão de tamanho (*size exclusion chromatography*, SEC). Nessa técnica, os componentes de menor tamanho vão interagir mais com a coluna ao entrarem mais facilmente nos poros, percorrendo um percurso maior até o final da coluna. Os componentes de maior tamanho não entrarão em poros de diâmetro menores e, portanto, serão eluidos da coluna em menor tempo de retenção (CYTIVA, 2022).

**Figura 2.5 – Representação da cromatografia por exclusão de tamanho.**



Fonte: MOJSIEWICZ-PENKOWSKA, 2013. Adaptado.

Diante disso, dado que a ASNase é uma macromolécula com um tamanho de aproximadamente 37 kDa e o imidazol é um composto orgânico com massa molecular de 68 g/mol, a cromatografia por exclusão de tamanho se mostra como uma boa solução para a separação da ASNase e do imidazol restante eluido na cromatografia de troca iônica. Como a concentração de imidazol nas amostras desse eluato já são baixas, é possível que utilizar essa técnica como mais uma etapa de purificação não fosse vantajosa ao prejudicar a recuperação da proteína. Porém, pensar em utilizar esta técnica como uma análise quantitativa de teor de imidazol pode trazer contribuições no controle de qualidade do processo de purificação.

## 2.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Assim como nos processos químicos, o processo de produção de uma proteína recombinante também pode sofrer flutuações, interferindo na especificação e conformidade do produto final. Essas flutuações podem ocorrer durante toda cadeia produtiva, desde o cultivo da célula, na expressão da proteína, nas etapas de purificação, na formulação final e até no envase. Diante disso, o controle de qualidade durante o processo, além do controle de qualidade do produto acabado, se torna importante para identificar e tomar ações corretivas frente a variabilidade na composição que possa ocorrer (MILLER et al., 2020).

Uma das formas de se garantir a qualidade do processo e do produto acabado é por meio de análises químicas realizadas metodologicamente. Através de métodos analíticos é possível determinar características químicas de uma amostra como: concentração celular, concentração de proteínas totais, concentração de impurezas, atividade enzimática, entre outros, e assim comparar com a especificação esperada.

### 2.4.1 Validação analítica

Para o desenvolvimento de um método analítico, é necessário realizar sua validação. A validação garante que, através de estudos experimentais, o método analítico seja confiável e que atenda as exigências das aplicações analíticas. Os ensaios experimentais de validação devem avaliar determinados parâmetros analíticos, como: especificidade, seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (MELO, ANALYTICA).

As agências reguladoras são responsáveis por disponibilizar regulamentações para a validação de métodos analíticos que contém exigências e algumas instruções para a avaliação de cada parâmetro. No contexto de validação de métodos analíticos para produtos biológicos, se destacam como agências reguladoras a brasileira Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através de sua RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, e a europeia ICH (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano) através do guia Q2(R2).

### 2.4.2 Parâmetros analíticos

#### 2.4.2.1 Precisão

A precisão é um parâmetro que mede a variabilidade de resultados de uma medição. De acordo com a Anvisa, ela deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reproduzibilidade.

A repetibilidade é a variabilidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra em um mesmo ensaio. Para isso, a Anvisa determina que:

*“Art. 38 A determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios: I - avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.*

*II - utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.”*

A precisão intermediária é entendida como a variabilidade dos resultados de uma mesma amostra feita em dias diferentes, por operadores diferentes. E a reprodutibilidade é entendida como a variabilidade dos resultados de uma mesma amostra feita em laboratórios diferentes.

Estatisticamente, a Anvisa regulamenta que a precisão deve ser avaliada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), dado pela Equação (2.1), onde DP é o desvio padrão, e  $\bar{X}$ , a média aritmética dos valores. Além disso, as amostras devem ser preparadas de maneira independente desde o início do procedimento descrito no método.

$$\text{DPR (\%)} = \frac{\text{DP}}{\bar{X}} * 100 \quad (2.1)$$

#### 2.4.2.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (Anvisa). Para isso, a Anvisa também regulamenta que:

*“Art. 25 Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da SQR para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata.*

*Parágrafo único. As soluções utilizadas para avaliação da linearidade devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR.*

*(...)*

*Art. 27 Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados:*

- I - representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;*
- II - gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;*
- III.- equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;*
- IV.- avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r<sup>2</sup>);*
- V.- avaliação da significância do coeficiente angular.*
- (...)*
- § 3o O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990.*
- § 4o O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.”*

#### 2.4.2.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho de um método analítico quantitativo é o intervalo de valores em que o método pode ser aplicado com precisão e exatidão. Para a determinação da faixa de trabalho, a Anvisa regulamenta que:

- “Art. 32 Devem ser consideradas as seguintes faixas de trabalho:*
- (...)*
- IV.- para determinação de impurezas: do limite de quantificação até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual;”*

#### 2.4.2.4 Seletividade

A seletividade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de avaliar os analitos de interesse na presença de componentes que possam interferir na sua identificação e/ou quantificação em uma amostra com matriz complexa.

Nos testes de identificação, é possível demonstrar que o método é capaz de identificar o analito obtendo resultados positivos comparando materiais de referência e amostra contendo o analito juntamente com resultados negativos de amostras que não contém o analito. Para separações cromatográficas, a seletividade pode ser demonstrada pela resolução dos picos de cada componente (ICH, 2022).

Nos testes de quantificação, a ausência de interferência da matriz pode ser demonstrada por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância química de referência (SQR) do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. As curvas devem ser estabelecidas da mesma forma que na

linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando, no mínimo, cinco concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (Anvisa, 2017).

#### 2.4.2.5 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que avalia a proximidade do valor medido com o valor considerado verdadeiro, geralmente proveniente de padrão bem caracterizado.

Para a avaliação da exatidão do método, a Anvisa regulamenta que:

*“Art. 43 A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível.*

*Art. 44 As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR.”*

Além disso, ela regulamenta que, para quantificação de impurezas, pode-se aplicar o método de adição de padrão e expressar a exatidão pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra dado pela Equação (2.2), onde  $C_{amostra\ adicionada}$  é o resultado da concentração de imidazol na amostra adicionada de padrão,  $C_{amostra}$  é o resultado da concentração de imidazol na amostra sem adição de padrão e  $C_{teórica}$  é a concentração teórica que aquela amostra deveria ter de imidazol após a adição de padrão.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{amostra\ adicionada} - C_{amostra})}{C_{teórica}} * 100 \quad (2.2)$$

#### 2.4.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção é a menor concentração de analito que é possível detectar e se distinguir do valor na ausência do analito (branco). Já o limite de quantificação é a menor concentração de analito que é possível quantificar com a precisão e exatidão obtidas previamente.

De acordo com a Anvisa, para métodos instrumentais, o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) podem ser obtidos através dos resultados da curva analítica segundo a Equação (2.3) e (2.4), onde  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica e  $\sigma$  é o desvio padrão

que pode ser obtido a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção.

$$LD = \frac{3,3 * \sigma}{a} \quad (2.3)$$

$$LQ = \frac{10 * \sigma}{a} \quad (2.4)$$

Além disso, a Anvisa também regulamenta que devem ser testadas precisão e exatidão nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação.

#### 2.4.2.7 Robustez

A robustez de um método analítico é um parâmetro que avalia a invariabilidade dos resultados obtidos na presença de variações na metodologia. Para métodos cromatográficos, a robustez pode ser comprovada com a verificação dos resultados obtidos frente a variações na vazão, pH e composição da fase móvel além do uso de reagentes e colunas de fabricantes diferentes. Assim, um método quantitativo pode ser considerado robusto para determinada condição experimental se ele atender os critérios de aceitação de exatidão.

#### 2.4.2.8 Parâmetros exigidos

Os parâmetros exigidos para a validação de um método analítico dependem da finalidade do método: identificação, teste de impurezas (quantitativo ou ensaio limite) e doseamento (dissolução, uniformidade do produto e potência). Para a Anvisa, os parâmetros exigidos para cada método estão expressos na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1 – Parâmetros analíticos exigidos para cada tipo de método.**

Parâmetro avaliado	Identificação	Teste de impurezas		
		Quantitativo	Ensaio	Doseamento
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão intermediária	Não	Sim <sup>(1)</sup>	Não	Sim <sup>(1)</sup>
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não <sup>(3)</sup>	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não <sup>(3)</sup>
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Faixa de trabalho	Não	Sim	Não	Sim

(1) Nos casos em que for conduzida a reproduibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

(2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

Fonte: Anvisa, 2017.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 EQUIPAMENTO

O equipamento cromatográfico utilizado nos procedimentos experimentais foi o *AKTA Purifier System* (Cytiva), ilustrado na Figura 3.1, contendo uma bomba (P-900), uma válvula de injeção (INV-907), um detector de UV (UV-900), e um pHmetro/conduímetro (pH/C-900). A coluna utilizada foi a *TSKgel G5000PWXL* (Tosoh Bioscience).

**Figura 3.1 – Cromatógrafo utilizado nos procedimentos experimentais.**



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com o protocolo interno do laboratório, a bomba foi configurada para bombear a fase móvel a 1 mL/min, não ultrapassando a pressão de 2 MPa. Após a estabilização da fase móvel, as injeções foram realizadas adicionando manualmente, com auxílio de uma seringa, 100  $\mu$ L da amostra em um loop de 70  $\mu$ L, translúcido, garantindo a ausência de bolhas. A saída dos componentes da amostra foi acompanhada pelo detector UV no comprimento de onda de 215 nm que transmite sinal eletrônico ao software *UNICORN*<sup>TM</sup>, onde foram obtidos os cromatogramas. Além disso, a integração dos picos e a obtenção de suas áreas também foram realizadas no próprio *software*.

### 3.2 AMOSTRA

A amostra utilizada em todas as análises foi doada pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ, que produziu e purificou a enzima seguindo o protocolo interno que se resume abaixo:

A produção da ANSase de *Zymomonas mobilis* foi realizada através de uma fermentação conduzida em erlenmeyer de 2 L utilizando *Escherichia coli* BL21 pET26b/ans como agente da fermentação e, então, se seguiu para o rompimento da célula por homogeneizador de alta

pressão. A purificação da enzima primeiramente consistiu na passagem por uma coluna de afinidade *HisTrap® HP* (Cytiva), onde a eluição da proteína foi feita em tampão rico em imidazol. Em seguida, passou por uma coluna de exclusão de tamanho *HiTrap® Desalting* (Cytiva), eluindo com PBS pH 8. E, por fim, passou por uma coluna de troca iônica *HiScreen™ HP* (Cytiva), eluindo com 1 M de NaCl em PBS pH 8.

As frações obtidas da coluna de troca iônica foram analisadas por SDS-PAGE e, aquelas que continham bandas de 37 kDa visivelmente mais espessas foram misturadas formando uma única amostra. Essa amostra teve seu teor de proteínas totais quantificado, obtendo o valor de 0,3 mg/mL.

### 3.3 SOLUÇÕES

#### 3.3.1 Fase móvel (PBS pH 8)

A fase móvel foi feita transferindo, quantitativamente, 0,336 g de fosfato de potássio monobásico anidro e 9,119 g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado em um balão volumétrico de 1 L. Completou-se o balão com água destilada, homogeneizou-se a solução e a transferiu para frasco de 1 L. O pH foi aferido com o uso de um pHmetro.

#### 3.3.2 Imidazol 2 mM

A solução padrão de imidazol 2 mM foi feita diluindo uma solução 100 mM para 20 mM que, por sua vez, foi diluída para 2 mM. Para tanto, transferiu-se, quantitativamente, 1,700 g de imidazol (Merck, nº de catálogo 1047161000) em um balão volumétrico de 250 mL. Completou-se o balão com PBS e homogeneizou-se a solução. Dessa solução, transferiu-se 10 mL para um balão volumétrico de 50 mL, completando com PBS e homogeneizando. Por fim, desta última solução, transferiu-se 5 mL para um balão volumétrico de 50 mL, completando com PBS e homogeneizando. Armazenou-se a solução no próprio balão em geladeira de 2 a 8°C.

### 3.4 PARÂMETROS ANALÍTICOS

O método analítico a ser avaliado neste trabalho foi o de teor de impurezas quantitativo. Portanto, os parâmetros analíticos exigidos pela Anvisa para a validação deste método, de acordo com a Tabela 2.1, são: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação.

Para avaliar todos esses parâmetros, foram construídas 2 curvas experimentais: uma curva do padrão de imidazol diluída em PBS e uma curva da amostra fortificada com padrão de

imidazol, ambas nas mesmas concentrações de imidazol adicionado: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mM. Cada curva foi construída a partir da solução de imidazol 1 mM, amostra e PBS de acordo com a Tabela 3.1 e 3.2. A solução de imidazol 1 mM, por sua vez, é proveniente da diluição 1:2 da solução de imidazol 2 mM. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata. O experimento foi repetido mais uma vez, de forma independente, partindo da mesma solução de imidazol 2 mM, diluindo-a para 1 mM e preparando a curva conforme descrito.

**Tabela 3.1 – Construção da curva padrão.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Volume de imidazol 1 mM (μL)	Volume de PBS (μL)
0,05	25	475
0,10	50	450
0,15	75	425
0,20	100	400
0,25	125	275

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 3.2 – Construção da curva de amostra fortificada.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Volume de amostra (μL)	Volume de imidazol 1 mM (μL)	Volume de PBS (μL)
0,05	250	25	225
0,10	250	50	200
0,15	250	75	175
0,20	250	100	150
0,25	250	125	125

Fonte: Elaboração própria.

A avaliação da precisão do método foi dividida na avaliação da repetibilidade e avaliação da precisão intermediária. Para a repetibilidade, foram avaliados os desvios padrão relativo da triplicada de cada ponto, em cada experimento independente. Para a precisão intermediária, utilizou-se o mesmo analista e foram avaliados os desvios padrão relativo entre a média da concentração de cada ponto nos dois experimentos.

Para avaliar a linearidade do método, foram construídos gráficos das médias das áreas dos picos das curvas padrão dos dois experimentos em função da concentração de imidazol adicionado. Além disso, foi realizada a regressão linear dos gráficos, obtendo a equação da reta com os coeficientes angulares e lineares e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e correlação (r).

Foram utilizadas duas formas para avaliar a seletividade do método. A primeira se baseia na observação das resoluções dos picos do imidazol nas curvas de amostra fortificada. As resoluções foram calculadas automaticamente pelo software *UNICORN™*, que utiliza a Equação (3.1) a seguir, onde  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $w_{h1}$  e  $w_{h2}$  são os tempos de retenção e a largura da base do pico (em meia altura) da enzima e do imidazol, respectivamente.

$$\text{Resolução} = 1,177 * \frac{t_2 - t_1}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (3.1)$$

A outra forma se baseia na ausência de interferência da matriz demonstrada através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas padrão e da curva de amostra fortificada. Como são apenas duas replicatas de cada curva, optou-se por coletar todos os coeficientes angulares a cada dois pontos para cada curva e realizar o teste “t” de *Student* entre elas para conferir se as médias dos coeficientes angulares são estatisticamente equivalentes.

Para avaliar a exatidão do método, foram calculadas as recuperações pela Equação (2.2) de cada curva, em cada experimento.

Para determinar a faixa de trabalho, levou-se em consideração a precisão e exatidão de todos os pontos experimentais e se eles estão em uma faixa linear.

O limite de detecção e quantificação do método foi calculado através dos resultados da curva padrão e das Equações (2.3) e (2.4), respectivamente. Porém, como o valor obtido para o limite de quantificação não será testado, será admitido que o limite de quantificação é o limite inferior da faixa de trabalho.

### 3.4.1 Critérios de aceitação

Mesmo com toda a regulamentação da Anvisa através da RDC Nº 166 em relação a validação de métodos analíticos, a agência não é clara quanto a alguns critérios de aceitação. No entanto, os critérios de aceitação comumente utilizados na literatura envolvendo estudos analíticos não variam muito. Para este trabalho, foram considerados os critérios de aceitação apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 – Critérios de aceitação dos parâmetros analíticos.**

Parâmetro avaliado	Critério de aceitação
	Resolução dos picos $\geq 1,5$
Seletividade	Comparação entre os coeficientes angulares (nível de confiança de 95%)
Linearidade	$r \geq 0,990$
Limite de quantificação	DPR dos coeficientes lineares $\leq 10\%$
Limite de detecção	DPR dos coeficientes lineares $\leq 10\%$
Exatidão	Recuperação entre 80 e 120% (DIAS, 2019)
Repetibilidade	DPR $\leq 10\%$
Precisão intermediária	DPR $\leq 10\%$

Fonte: Elaboração própria.

## 4 RESULTADOS

Os cromatogramas e os valores das áreas do pico do imidazol obtidos para cada ponto das curvas estão apresentados Apêndice A e B.

De acordo com o cromatograma, a ASNase foi eluida em dois picos cromatográficos. É possível que parte da ASNase, que é uma proteína tetramérica, esteja na forma de oligômeros e, por isso, é eluida em dois picos.

**Figura 4.1 – Curva padrão (1)**

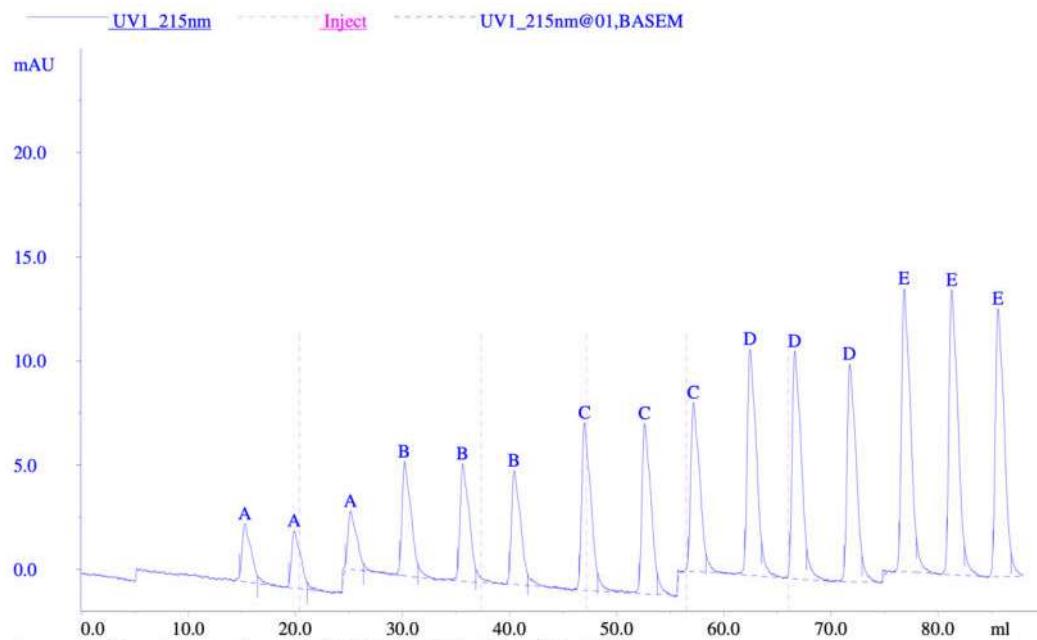


Figura 4.1: Os picos cromatográficos A, B, C, D e E são, respectivamente, triplicatas dos pontos de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mM de imidazol.

**Figura 4.2 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (1)**

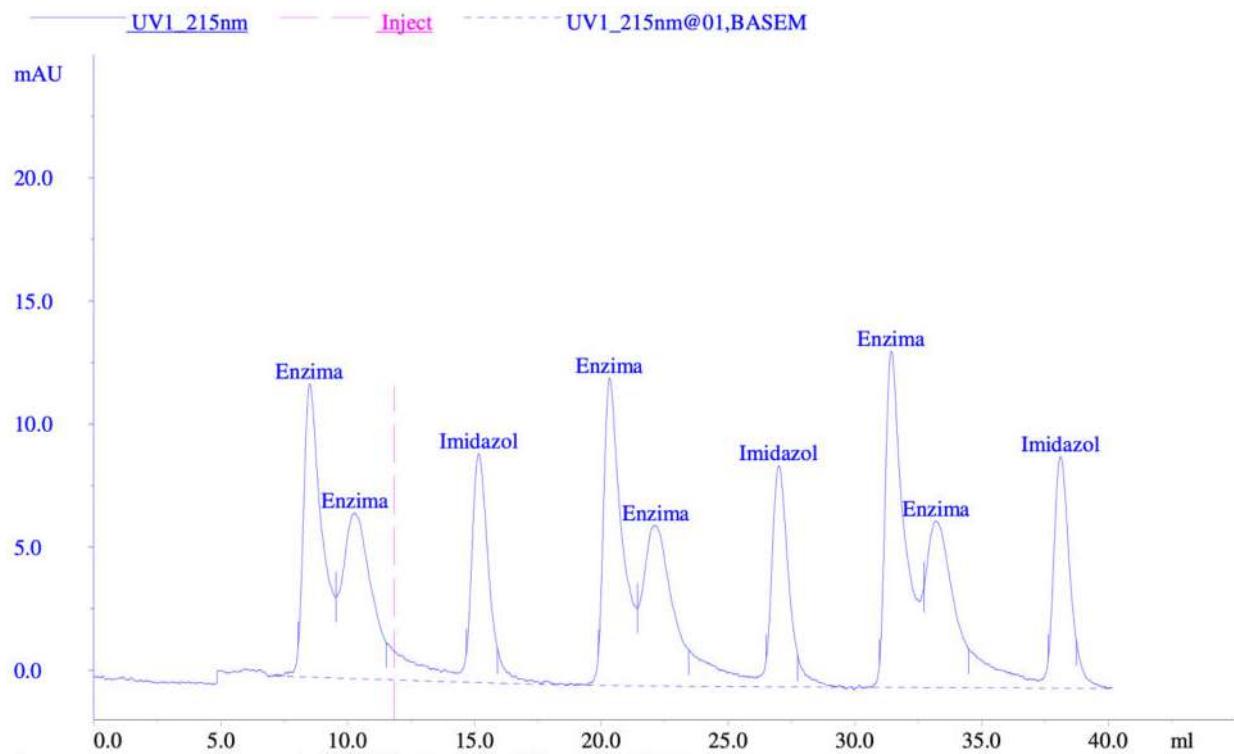


Figura 4.2: Triplicata do ponto 0,05 mM da curva de amostra fortificada.

#### 4.1 PRECISÃO

Para avaliar a repetibilidade, as médias e desvios-padrão relativo das replicatas foram calculados para cada curva e estão apresentadas na Tabelas 4.1 e 4.2.

**Tabela 4.1 – Resultados de repetibilidade da curva padrão.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Curva padrão (1)		Curva padrão (2)	
	Média (mAU*mL)	DPR (%)	Média (mAU*mL)	DPR (%)
0,05	2,6112	0,3	2,5538	6,9
0,10	5,2058	2,2	5,1105	1,8
0,15	7,6036	1,4	7,4238	1,4
0,20	9,9802	2,1	9,7445	3,9
0,25	12,3308	3,1	12,1170	2,9

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 4.2 – Resultados de repetibilidade da curva de amostra fortificada.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Curva de amostra fortificada (1)		Curva de amostra fortificada (2)	
	Média (mAU*mL)	DPR (%)	Média (mAU*mL)	DPR (%)
0,00	4,1913	0,7	4,1967	3,9
0,05	6,4379	2,2	6,2667	1,8
0,10	9,2821	0,8	9,1389	1,5
0,15	12,6110	0,5	11,5636	4,6
0,20	15,0874	1,3	14,5466	3,2
0,25	17,9831	0,6	17,4433	1,2

Fonte: Elaboração própria.

Para avaliar a precisão intermediária, as médias e desvios-padrão relativo das concentrações médias de cada curva foram calculados e estão apresentadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3 – Resultados de precisão intermediária para cada curva.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Curva padrão		Curva de amostra fortificada	
	Média (mAU*mL)	DPR (%)	Média (mAU*mL)	DPR (%)
0,00	N/A	N/A	4,1940	0,1
0,05	2,5825	1,6	6,3523	1,9
0,10	5,1582	1,3	9,2105	1,1
0,15	7,5137	1,7	12,0873	6,1
0,20	9,8624	1,7	14,8170	2,6
0,25	12,2239	1,2	17,7132	2,2

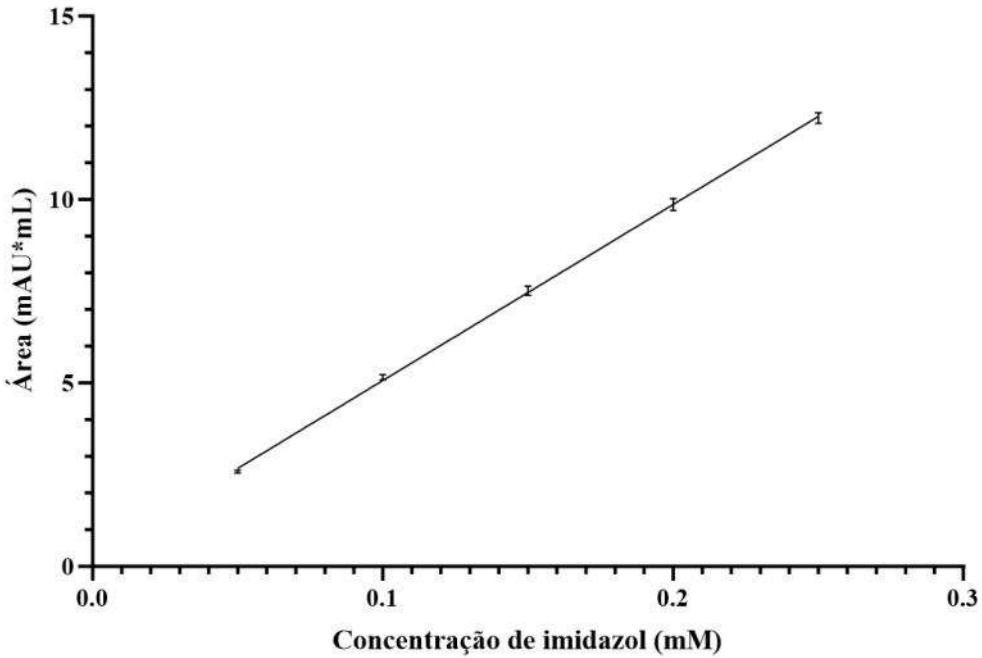
Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3, verifica-se que todos os valores de DPR são inferiores a 10%, cumprindo os requisitos estabelecidos na Tabela 3.3. No entanto, como para avaliar a precisão intermediária é necessário que o segundo experimento seja realizado por um segundo analista, não é possível dizer que o método atende aos requisitos exigidos pela Anvisa para este parâmetro, apenas a repetibilidade.

#### 4.2 LINEARIDADE

Para avaliar a linearidade do método, foi construído o gráfico da curva padrão com as médias dos valores das áreas obtidos para cada ponto. A equação da reta foi obtida através da regressão linear da curva e seus parâmetros foram apresentados na Tabela 4.4.

**Figura 4.3 – Regressão linear da curva padrão.**



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 4.4 – Parâmetros da curva padrão.**

Parâmetros	
Coeficiente angular	47,974
Coeficiente linear	0,272
$r^2$	0,9997
$r$	0,9998

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Tabela 4.4, verifica-se que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero e o valor do coeficiente de correlação é maior que 0,990, cumprindo os requisitos estabelecidos na tabela 3.3. Porém, para a Anvisa, a linearidade precisa ser realizada avaliando três curvas padrões realizadas individualmente. A terceira curva não pôde ser realizada devido a limitação de volume de amostra. No entanto, os resultados obtidos até agora indicam uma linearidade do método nesse intervalo de concentrações.

Apesar do ensaio ter demonstrado boa precisão entre as duas curvas padrão construídas, uma terceira curva independente poderia ser interessante em trabalhos futuros para avaliar a necessidade de realizar uma curva padrão a cada análise de rotina.

### 4.3 SELETIVIDADE

Uma das formas utilizadas para avaliar a seletividade do método, foi através do cálculo das resoluções dos picos de imidazol na curva de amostra fortificada. Todos os resultados estão mostrados na Tabela 4.5 e mostram que todos os valores de resolução foram maiores que 1,5, atendendo ao critério de aceitação estabelecido. Este resultado indica que os componentes (a proteína e o imidazol) não foram eluidos juntos e, portanto, a área obtida para o imidazol é referente somente ao imidazol.

**Tabela 4.5 – Valores de resolução dos picos cromatográficos.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Curva de amostra fortificada (1)			Curva de amostra fortificada (2)		
	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata	Replicata
	1	2	3	1	2	3
0,00	1,97	1,80	1,79	1,97	1,80	1,79
0,05	2,75	2,83	3,09	2,83	2,81	2,91
0,10	2,61	2,66	2,66	2,52	2,51	2,57
0,15	2,60	2,58	2,58	2,43	2,45	2,50
0,20	2,49	2,58	2,61	2,35	2,42	2,47
0,25	2,57	2,60	2,63	2,17	2,33	2,36

Fonte: Elaboração própria.

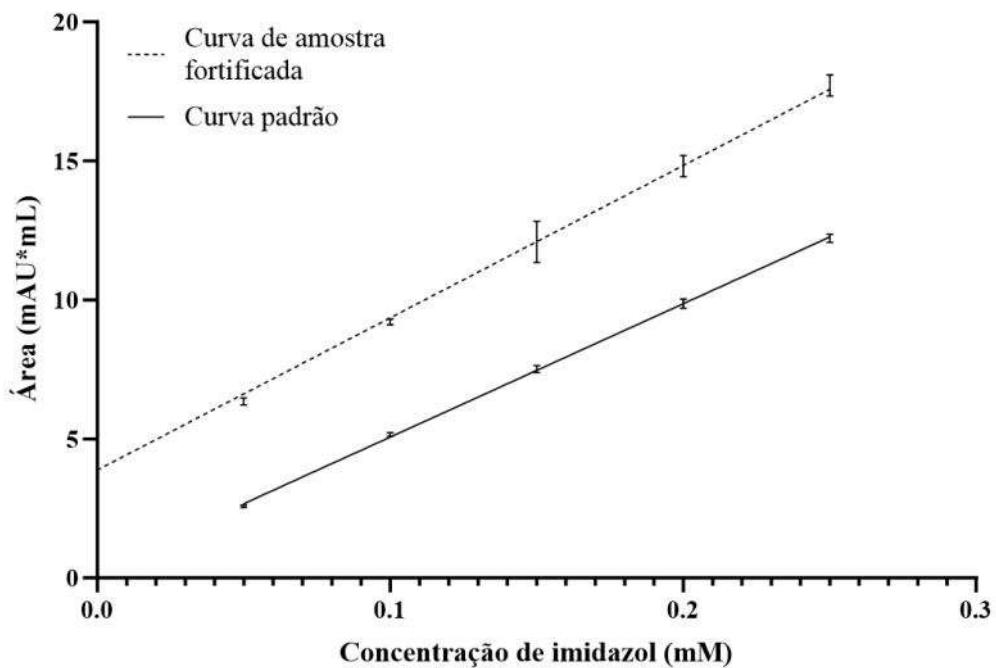
A outra forma utilizada para avaliar a seletividade do método, foi através da comparação dos coeficientes angulares das curvas padrão com as curvas de amostra fortificada. A Figura 4.2 mostra o gráfico das curvas médias e a Tabela 4.6 mostra os resultados dos parâmetros das regressões lineares.

**Tabela 4.6 – Parâmetros das regressões lineares.**

Parâmetros	Curva padrão	Curva de amostra
	média	fortificada média
Coeficiente angular	47,974	54,781
Coeficiente linear	0,272	3,8814
$r^2$	0,9997	0,9984
$r$	0,9998	0,9991

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 4.4 – Curvas médias padrão e amostra fortificada.**



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 4.7 – Coeficientes angulares.**

Concentração de imidazol	Curva padrão (1) (A)	Curva padrão (2) (B)	Curva de amostra fortificada (1) (C)	Curva de amostra fortificada (2) (D)
0,00 – 0,05	N/A	N/A	41,400	44,932
0,05 – 0,10	51,891	51,135	57,443	56,885
0,10 – 0,15	47,957	46,266	48,493	66,579
0,15 – 0,20	47,532	46,415	59,661	49,527
0,20 – 0,25	47,012	47,449	57,933	57,915

Fonte: Elaboração própria.

Com os resultados da Tabela 4.7 realizou-se o teste *t* de *Student* para comparar os grupos de coeficiente angulares a cada dois pontos para cada curva. O teste foi realizado no software *Graphpad* onde foi obtido o p-valor de 0,3172 para as colunas A e C, 0,2456 para as colunas A e D, 0,1734 para as colunas B e C, e 0,1340 para as colunas B e D. Como os p-valores foram maiores que 0,05, conclui-se que todas as curvas são estatisticamente paralelas, indicando a ausência de interferentes da matriz.

Para este trabalho não foi possível o estudo da não interferência de produtos de degradação na resposta analítica. Portanto, para trabalhos futuros, ainda são necessários estudos de estabilidade para garantir a seletividade do método nessas condições. Inclusive, para esse assunto, a Anvisa ressalta a importância desses ensaios:

*“Art. 21 Para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação.*

*§1º Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, é necessário expor a amostra a condições de degradação em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor e de luz.”*

#### 4.4 EXATIDÃO

Para avaliar a exatidão do método, foram calculadas as concentrações através da equação da reta obtida da curva padrão e, com isso, calcularam-se as recuperações de cada ponto das curvas de amostra fortificada. Todos os resultados estão apresentados na tabela 4.8.

**Tabela 4.8 – Valores de recuperação da curva de amostra fortificada.**

Concentração de imidazol adicionado (mM)	Curva de amostra fortificada (1)	Curva de amostra fortificada (2)		
	Concentração (mM)	Recuperação (%)	Concentração (mM)	Recuperação (%)
0,00	0,0817	N/A	0,0818	N/A
0,05	0,1285	93,7	0,1250	86,5
0,10	0,1878	106,1	0,1848	103,1
0,15	0,2572	117,0	0,2354	102,4
0,20	0,3088	113,6	0,2975	107,9
0,25	0,3692	115,0	0,3579	110,5

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Tabela 4.8, verifica-se que todos os valores de recuperação estão dentro do intervalo de 80-120%, cumprindo os requisitos estabelecidos pela Anvisa, conforme a Tabela 3.3. Portanto, pode-se considerar que, nesta faixa de concentrações, o método é considerado exato.

#### 4.5 FAIXA DE TRABALHO

Através da demonstração da repetibilidade, da exatidão e da linearidade do método na faixa de concentrações ensaiadas, pode-se determinar que a faixa de trabalho do método é justamente esse mesmo intervalo de 0,05 a 0,25 mM.

Além disso, de acordo com a Tabela 4.8, a concentração da amostra sem adição de padrão foi de 0,0817 mM. Como este valor está dentro da faixa de trabalho, é possível dizer que, aplicando o fator de diluição (2x), a concentração do estoque de amostra é de 0,1634 mM (3,71 µg de imidazol por 100 µg de proteína).

#### 4.6 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção do método foi calculado e está apresentado na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9 – Valores de limite de detecção calculados.**

Parâmetros	
Limite de detecção (mM)	0,0015
DPR (%)	2,2

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Tabela 4.9, verifica-se que o valor do DPR dos coeficientes lineares das curvas é menor que 10%, atendendo os requisitos estabelecidos pela Anvisa, conforme a Tabela 3.3. Portanto, pode-se considerar que o limite de detecção do método é 0,0015 mM.

#### 4.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação do método foi calculado e está apresentado na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10 – Valores de limite de detecção calculados.**

Parâmetros	
Limite de quantificação (mM)	0,0045
DPR (%)	2,2

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com as Tabela 4.10, verifica-se que o valor do DPR dos coeficientes lineares das curvas é menor que 10%, atendendo os requisitos da Tabela 3.3. Porém, como o valor obtido

para o limite de quantificação não foi testado, será admitido que o limite de quantificação é limite inferior da faixa de trabalho, 0,05 mM.

## 5 CONCLUSÕES

A partir de todos os resultados apresentados, é possível concluir que foram avaliados os parâmetros analíticos para a validação do método de quantificação por HPLC de imidazol em amostras de L-asparaginase e seus resultados estão dentro dos critérios de aceitação estabelecidos. Conclui-se, portanto, que o método é preciso, seletivo, exato, possui linearidade na sua faixa de trabalho de 0,05 a 0,25 mM com um limite de detecção de 0,0015 mM e limite de quantificação de 0,05 mM. Além disso, foi possível quantificar o imidazol presente no estoque de amostra, obtendo um valor 3,71 µg de imidazol por 100 µg de proteína. No entanto, é importante frisar que este método foi realizado para uma amostra produzida seguindo um protocolo específico de produção e purificação e, portanto, não se pode concluir que uma amostra de qualquer outro protocolo atenderá os critérios de aceitação dos parâmetros analíticos.

Para fins regulatórios, o método não foi completamente validado por falta de alguns ensaios exigidos pela Anvisa como, por exemplo, uma curva padrão realizada por outro analista para avaliar a precisão intermediária e uma terceira curva padrão para avaliar a linearidade e o limite de detecção. Portanto, a realização destes ensaios será necessária para o método fazer parte do controle de qualidade de um lote clínico. Além disso, outras sugestões podem ser feitas como: o uso de um equipamento qualificado, padrão de referência e instrumentos com a calibração em dia.

## 6 REFERÊNCIAS

SCHOLAR, Eric. **Acute Lymphocytic Leukemia**. In: ENNA, S.J. et al. XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780080552323608414>. Acesso em: 12 dez. 2023.

EMADI, Ashkan. **Leucemia linfoblástica aguda (LLA)**. MANUAL MSD, [S. l.], 1 jul. 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/casa/distúrbios-do-sangue/leucemias/leucemia-linfocítica-aguda-lla>. Acesso em: 12 dez. 2023.

TEIXEIRA, Carla S. Silva et al. **Cancer therapies based on enzymatic amino acid depletion**. In: FICAI, Anton et al. Nanostructures for Cancer Therapy. [S. l.: s. n.], 2017. cap. 24, p. 623-651. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323461443000246>. Acesso em: 12 dez. 2023.

MÜLLER, H.J. et al. **Use of L-asparaginase in childhood ALL**. Critical Reviews in Oncology/Hematology, [S. l.], p. 97-113, 1 ago. 1998. DOI 10.1016/S1040-8428(98)00015-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842898000158>. Acesso em: 12 dez. 2023.

EINSFELDT, Karen. **DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE Zymomonas mobilis PARA APLICAÇÃO COMO BIOFÁRMACO**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [S. l.], 2014. Disponível em: <http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/teses-de-doutorado/2014/294-desenvolvimento-de-uma-nova-l-asparaginase-recombinante-de-zymomonas-mobilis-para-aplicacao-como-biofarmaco/file>. Acesso em: 12 dez. 2023.

WASHINGTON, Mayara Paes Leme. **MODELAGEM DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE UTILIZANDO A ABORDAGEM DINÂMICA DA ANÁLISE DO BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [S. l.], 2016. Disponível em: <http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/dissertacoes-de-mestrado/2016/437--18/file>. Acesso em: 12 dez. 2023.

GONÇALVES, Vinícius de Lima. **OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE ZYMO MONAS MOBILIS PRODUZIDA POR ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/13581/1/VinicioDeLimaGoncalves-min.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.

ABUD, Ana Karla de Souza. **ESTUDO DO CONTROLE DE QUALIDADE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR ZYMO MONAS MOBILIS.** 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [S. l.], 2005. Disponível em: <http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/teses-de-doutorado/2005/259-estudo-do-controle-de-qualidade-do-processo-de-producao-de-l-asparaginase-porzymomonas-mobilis/file>. Acesso em: 12 dez. 2023.

DUONG-LY, Krisna C. et al. **Using Ion Exchange Chromatography to Purify a Recombinantly Expressed Protein.** In: LORSCH, Jon. Methods in Enzymology. [S. l.: s. n.], 2014. cap. 8, p. 95-103. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124201194000082>. Acesso em: 12 dez. 2023.

PIEŃKOWSKA, Krystyna Mojsiewicz et al. **Size Exclusion Chromatography a Useful Technique For Speciation Analysis of Polydimethylsiloxanes.** In: MOHAMMAD, Ali et al. Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes. [S. l.: s. n.], 2014. p. 181-202. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7735-4\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7735-4_9). Acesso em: 12 dez. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.** [S. l.], 24 jul. 2017. Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em: 12 dez. 2023.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Q2(R2), 24 March 2022. **VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES**, [S. l.], 24 mar. 2022.

DIAS, Francielle Regina Silva. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. 2019. Trabalho acadêmico (Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, [S. l.], 2019. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4655991/mod\\_resource/content/1/05\\_Desenvolvimento%20e%20Validação%20de%20Métodos\\_Francielle.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4655991/mod_resource/content/1/05_Desenvolvimento%20e%20Validação%20de%20Métodos_Francielle.pdf). Acesso em: 15 dez. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA (SP). **Tudo sobre leucemia linfoide aguda**. Manual ABRALE, [S. l.], p. 8-11, 1 jun. 2023. Disponível em: <https://www.abrale.org.br/wp-content/uploads/2023/06/Manual-de-LLA-web.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2023.

RAMON, Jose et al. **Integrated Lab-Scale Process Combining Purification and PEGylation of L-Asparaginase from Zymomonas mobilis**. Industrial & Engineering Chemistry Research, [S. l.], p. 6932–6939, 6 maio 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.1c00622>. Acesso em: 23 dez. 2023.

OZLEM, Coskun. **Separation techniques: Chromatography**. North Clin Istanbul, [s. l.], 11 nov. 2016. DOI 10.14744/nci.2016.32757. Disponível em: [http://jag.journalagent.com/nci/pdfs/NCI\\_3\\_2\\_156\\_160.pdf](http://jag.journalagent.com/nci/pdfs/NCI_3_2_156_160.pdf). Acesso em: 23 dez. 2023.

SHIMADZU (Japão). **What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?**. [S. l.]. Disponível em: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what\\_is\\_hplc.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html). Acesso em: 23 dez. 2023.

**PRINCÍPIOS de cromatografia a líquido (HPLC)**. [S. l.], 8 jan. 2019. Disponível em: <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/>. Acesso em: 23 dez. 2023.

**EXPLORING Qualitative and Quantitative Analysis in Chromatography: Processes and Techniques**. [S. l.], 13 dez. 2023. Disponível em:

<https://www.drawellanalytical.com/exploring-qualitative-and-quantitative-analysis-in-chromatography-processes-and-techniques/>. Acesso em: 23 dez. 2023.

DCTECH (SP). **Princípios da Biocromatografia.** [S. 1.]. Disponível em: <https://www.dctech.com.br/principios-da-biocromatografia/>. Acesso em: 23 dez. 2023.

**FUNDAMENTALS of size exclusion chromatography.** [S. 1.]. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/size-exclusion-chromatography#size>. Acesso em: 23 dez. 2023.

MILLER, W Greg et al. **Chapter 5 - Quality control.** Contemporary Practice in Clinical Chemistry, [s. 1.], p. 77-95, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128154991000053>. Acesso em: 23 dez. 2023.

**A IMPORTÂNCIA da Validação de Métodos Analíticos.** [S. 1.]. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-importancia-da-validacao-de-metodos-analiticos/>. Acesso em: 23 dez. 2023.

APÊNDICE A – Cromatogramas das curvas padrão e curva de amostra fortificada

**Figura A.1 – Curva padrão (1)**

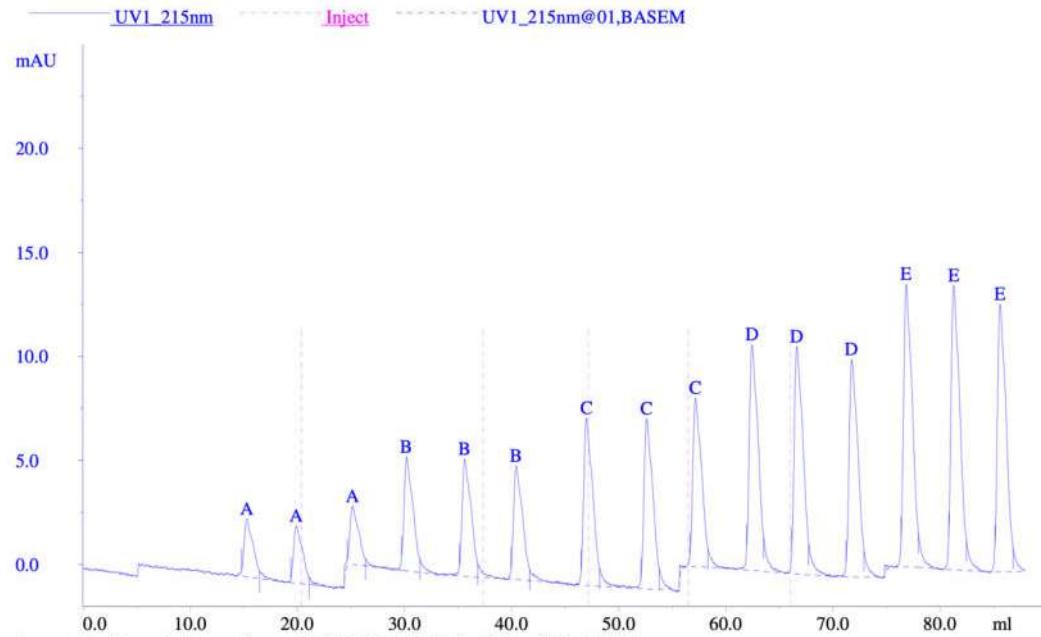


Figura A.1: Os picos cromatográficos A, B, C, D e E são, respectivamente, triplicatas dos pontos de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mM de imidazol.

**Figura A.2 – Curva padrão (2)**

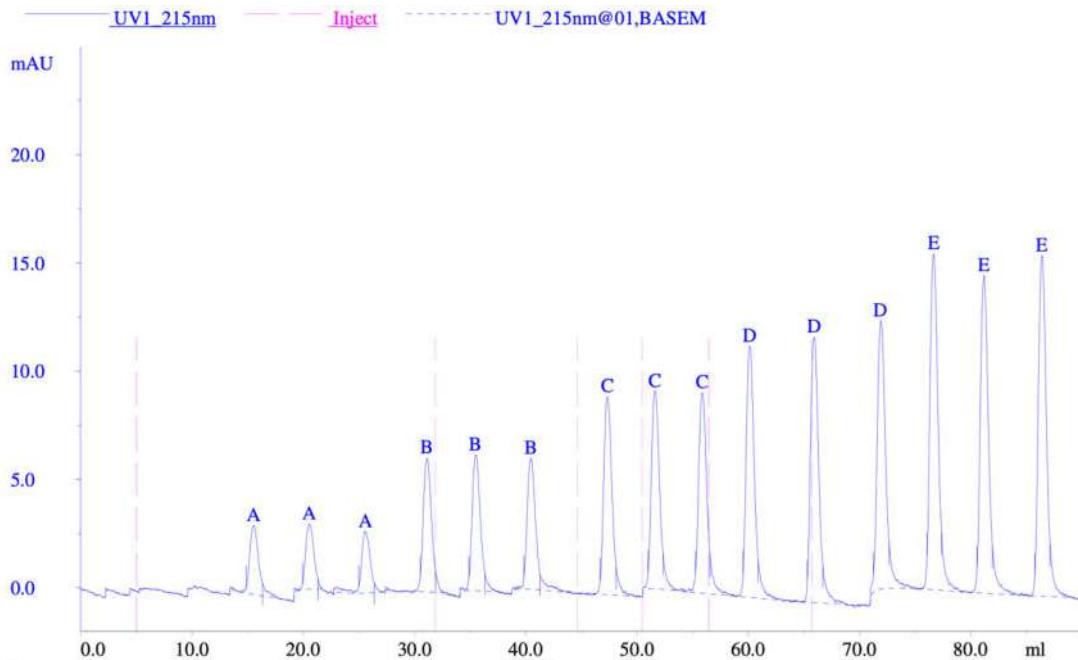


Figura A.2: Os picos cromatográficos A, B, C, D e E são, respectivamente, triplicatas dos pontos de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mM de imidazol.

**Figura A.3 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,00 mM (1)**

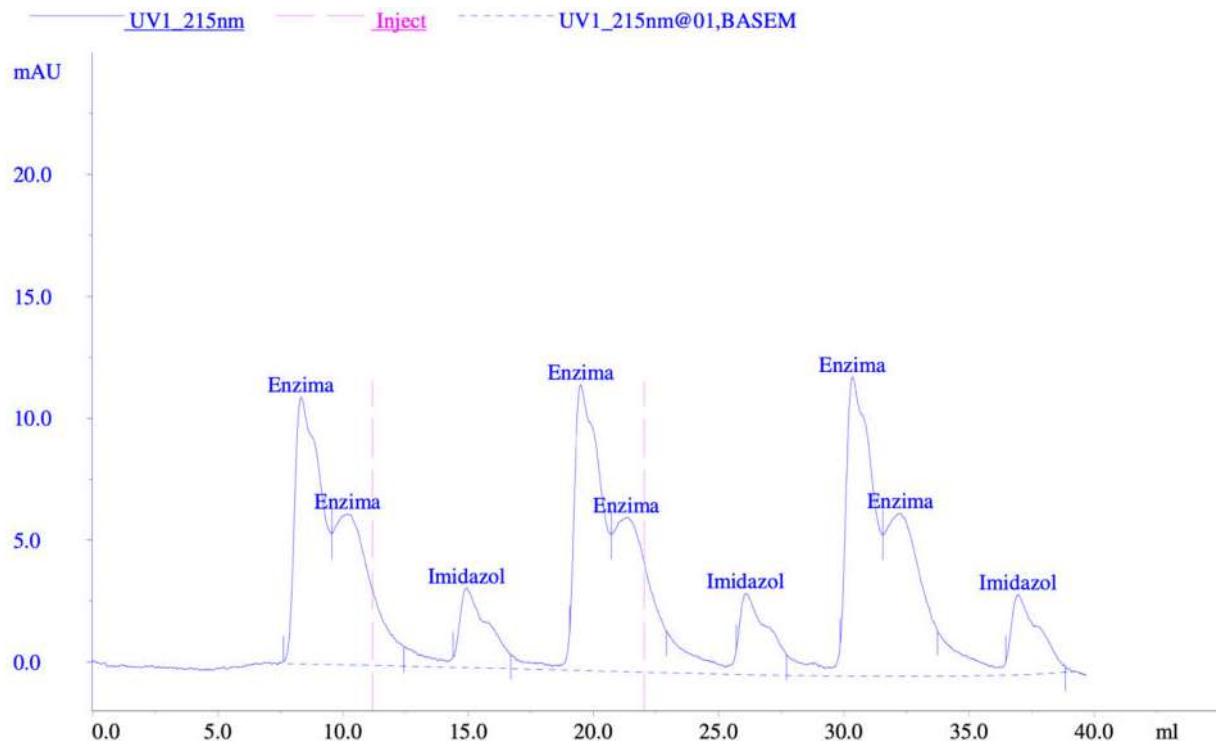


Figura A.3: Triplicata do ponto 0,00 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.4 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,00 mM (2)**

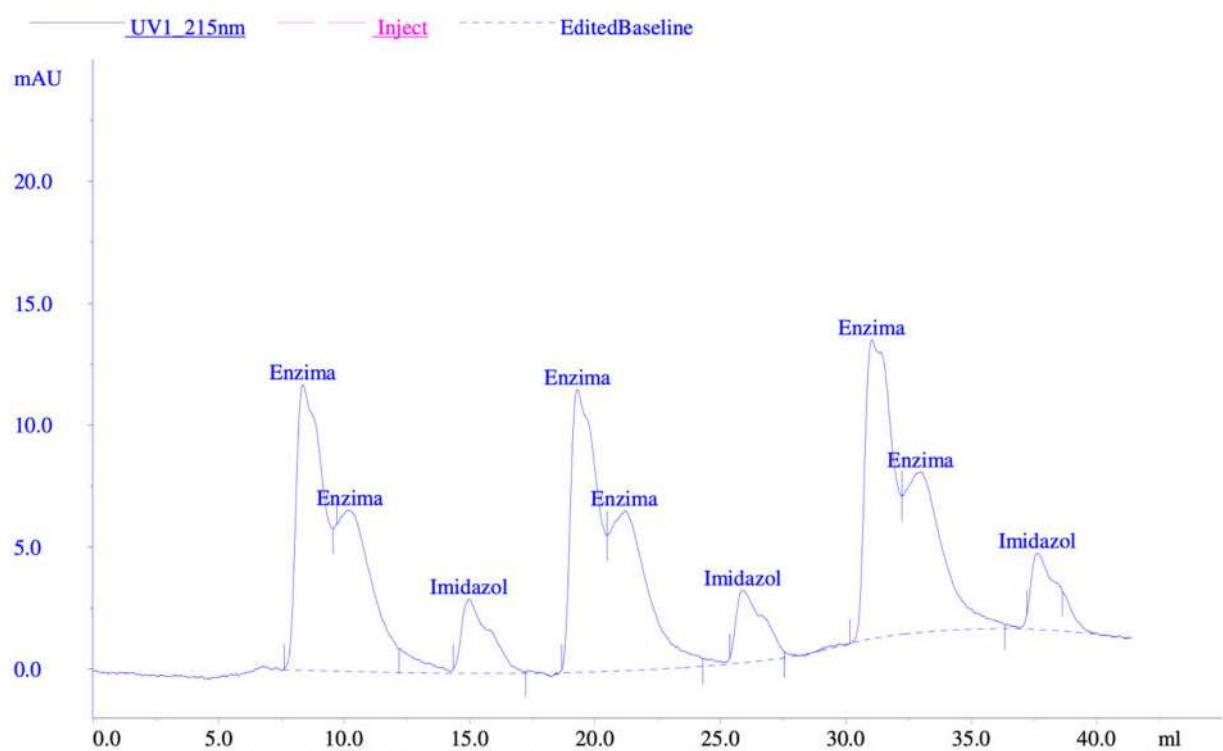


Figura A.4: Triplicata do ponto 0,00 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.5 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (1)**

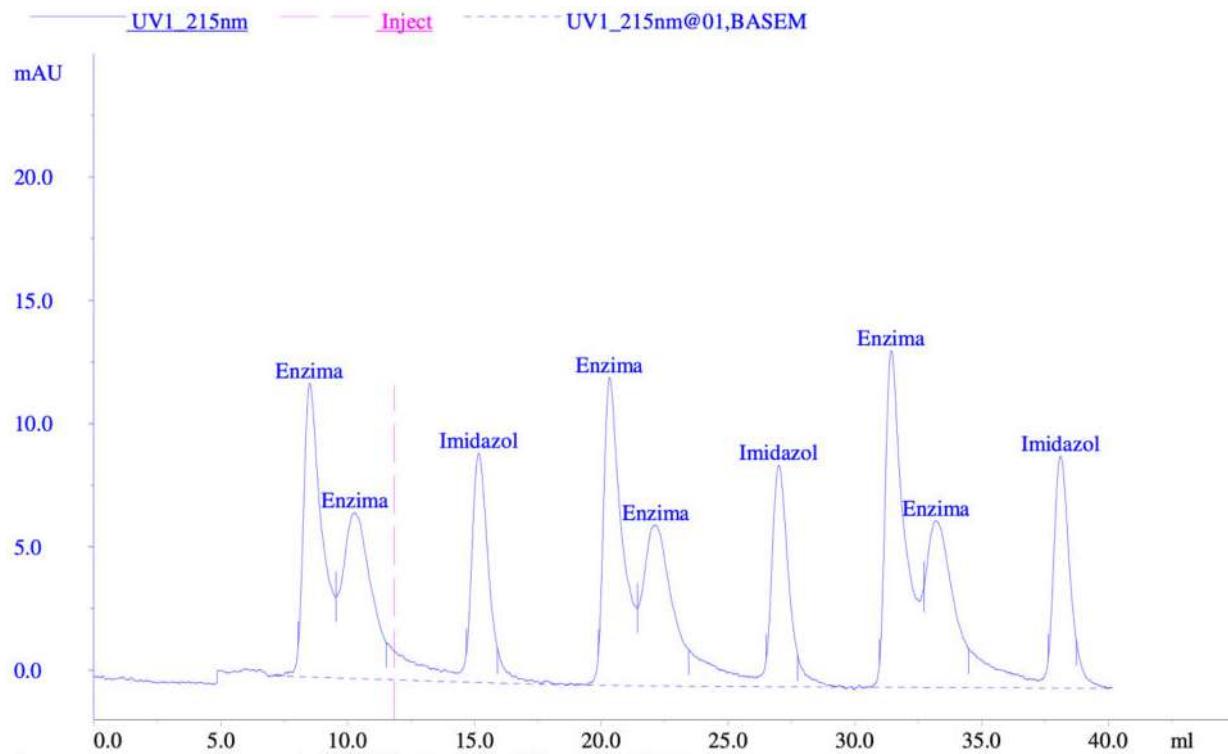


Figura A.5: Triplicata do ponto 0,05 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.6 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,05 mM (2)**

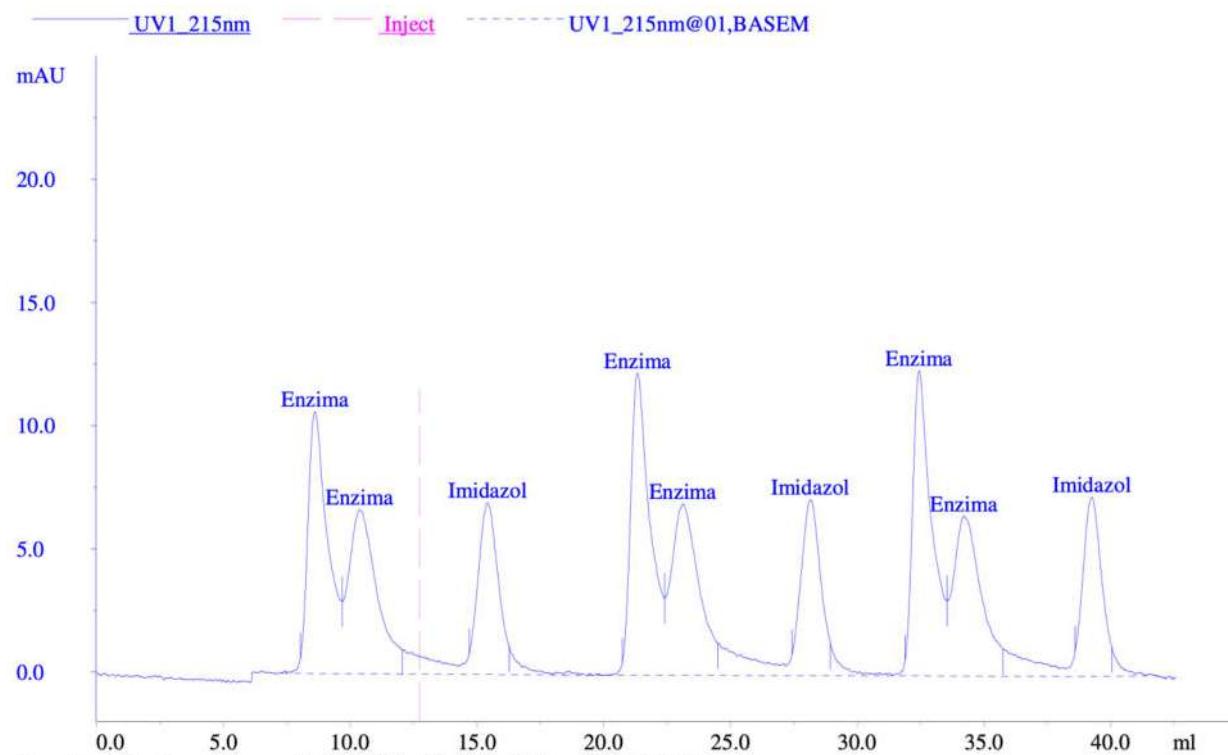


Figura A.6: Triplicata do ponto 0,05 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.7 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,10 mM (1)**

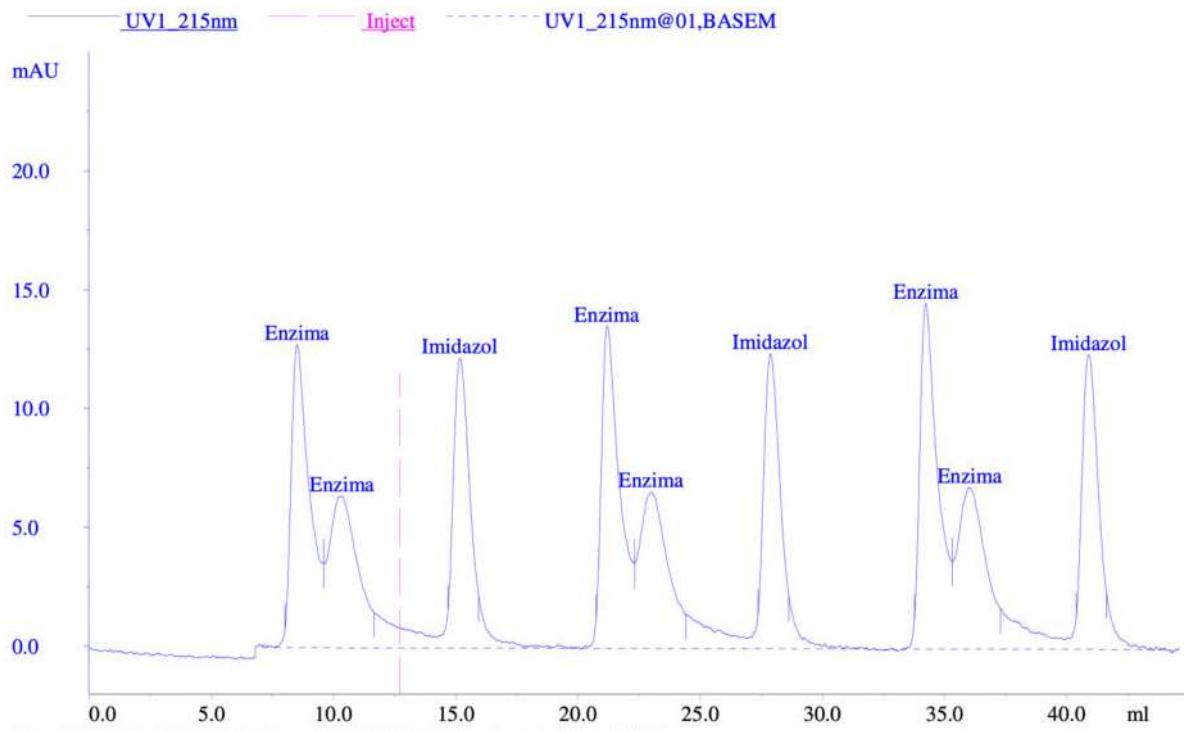


Figura A.7: Triplicata do ponto 0,10 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.8 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,10 mM (2)**

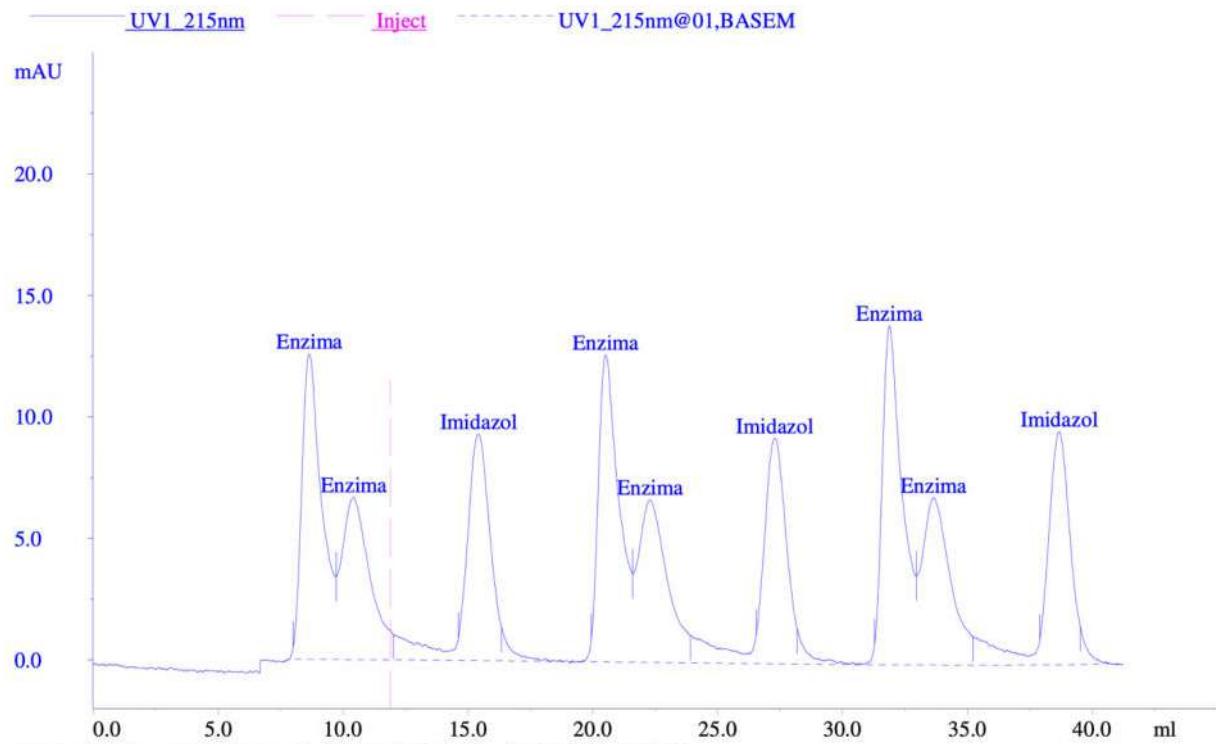


Figura A.8: Triplicata do ponto 0,10 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.9 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,15 mM (1)**

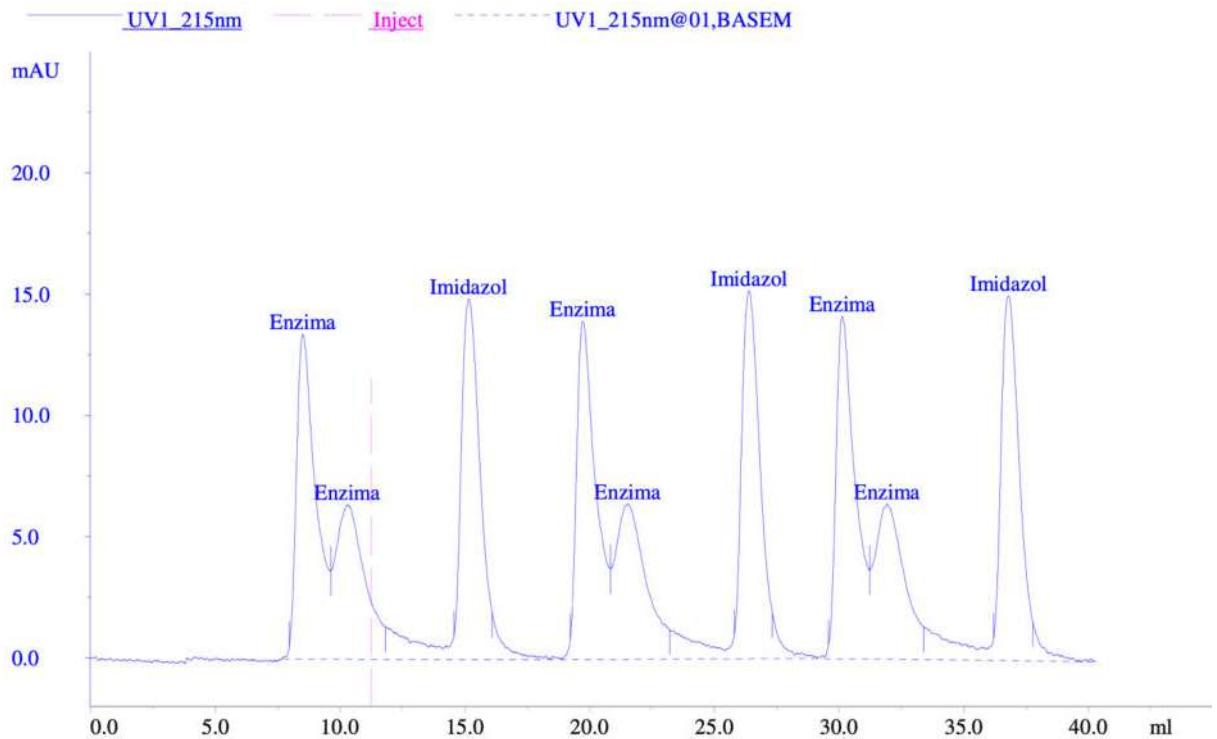


Figura A.9: Triplicata do ponto 0,15 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.10 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,15 mM (2)**

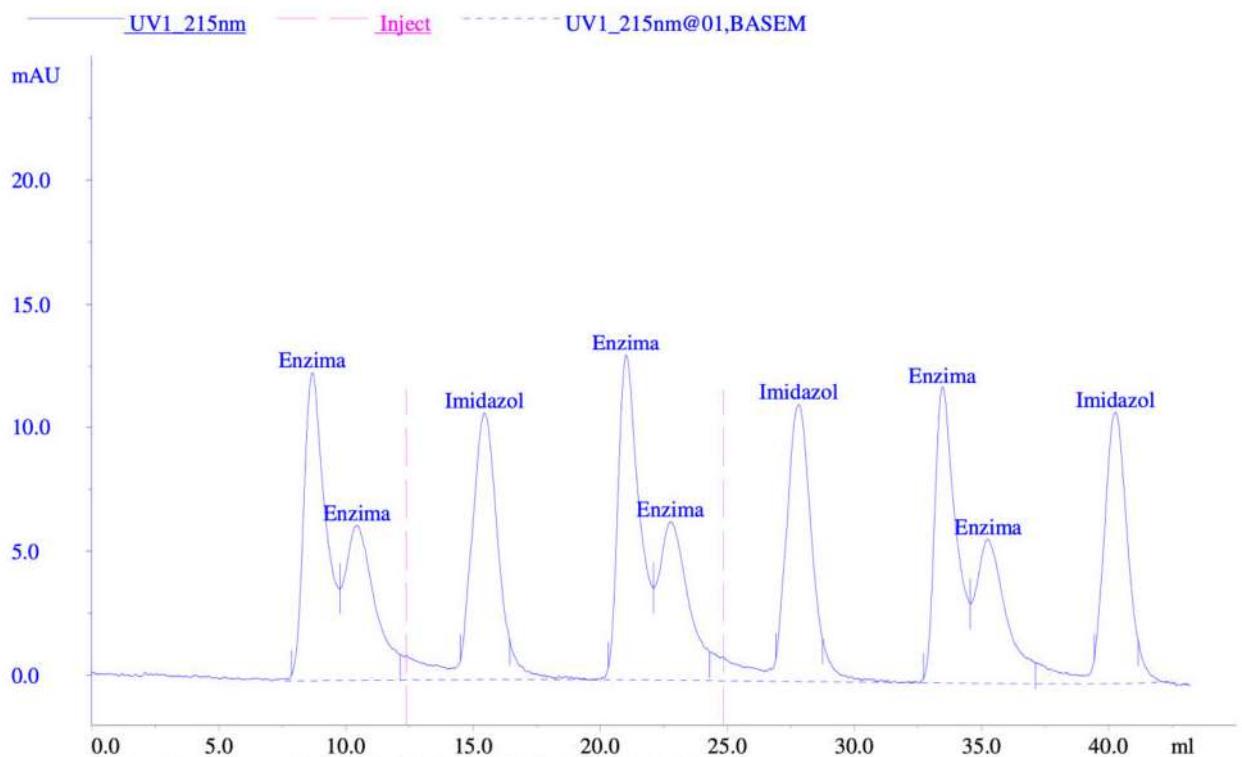


Figura A.10: Triplicata do ponto 0,15 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.11 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,20 mM (1)**

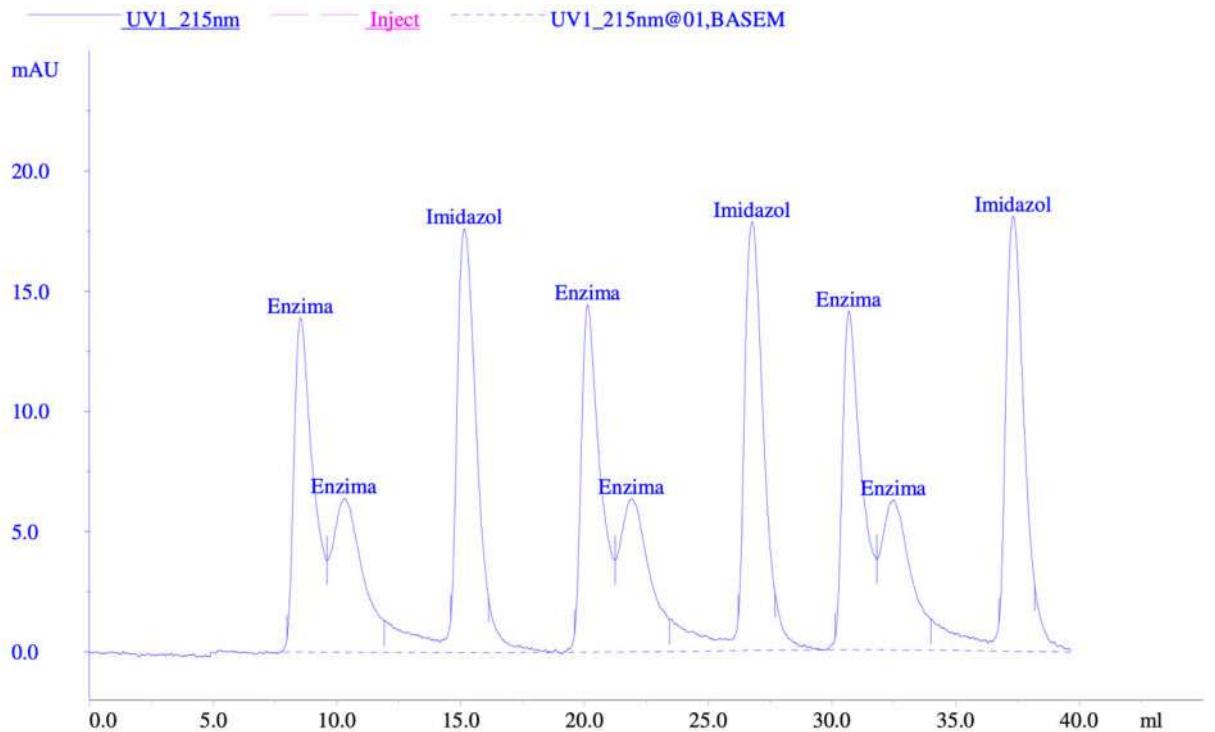


Figura A.11: Triplicata do ponto 0,20 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.12 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,20 mM (2)**

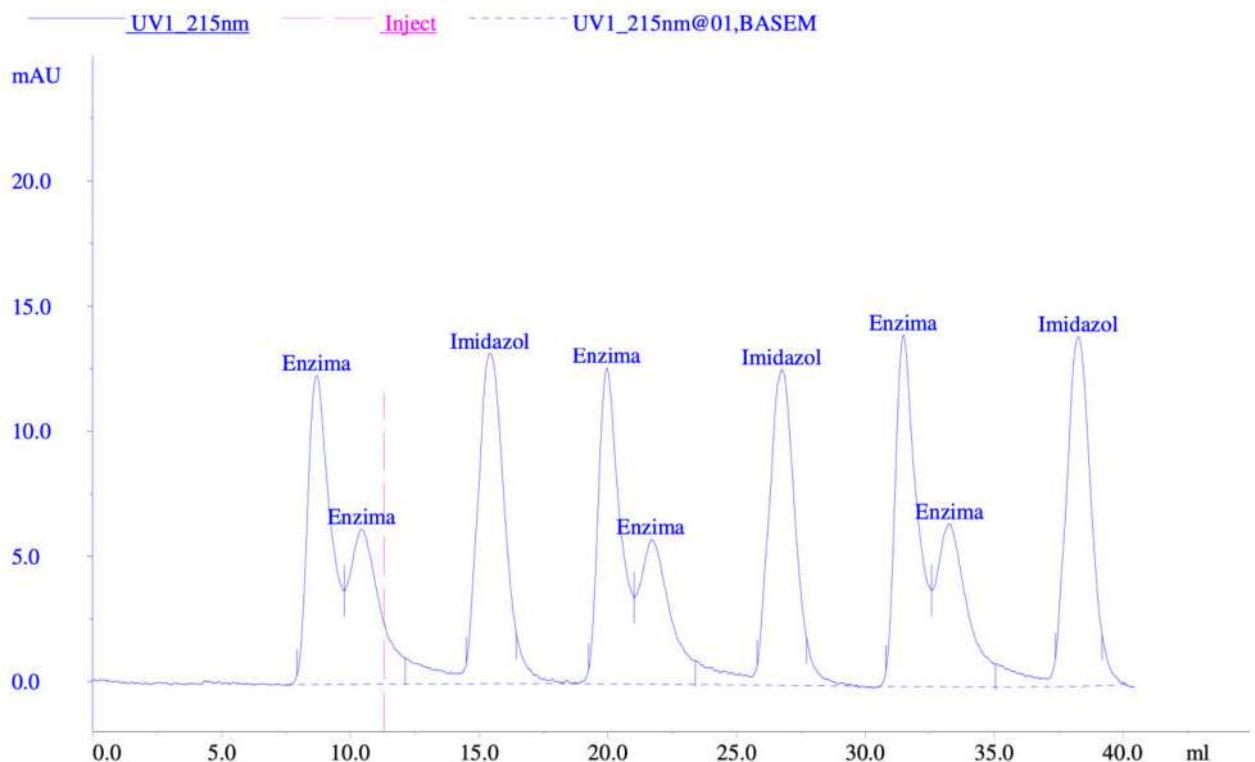


Figura A.12: Triplicata do ponto 0,20 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.13 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,25 mM (1)**

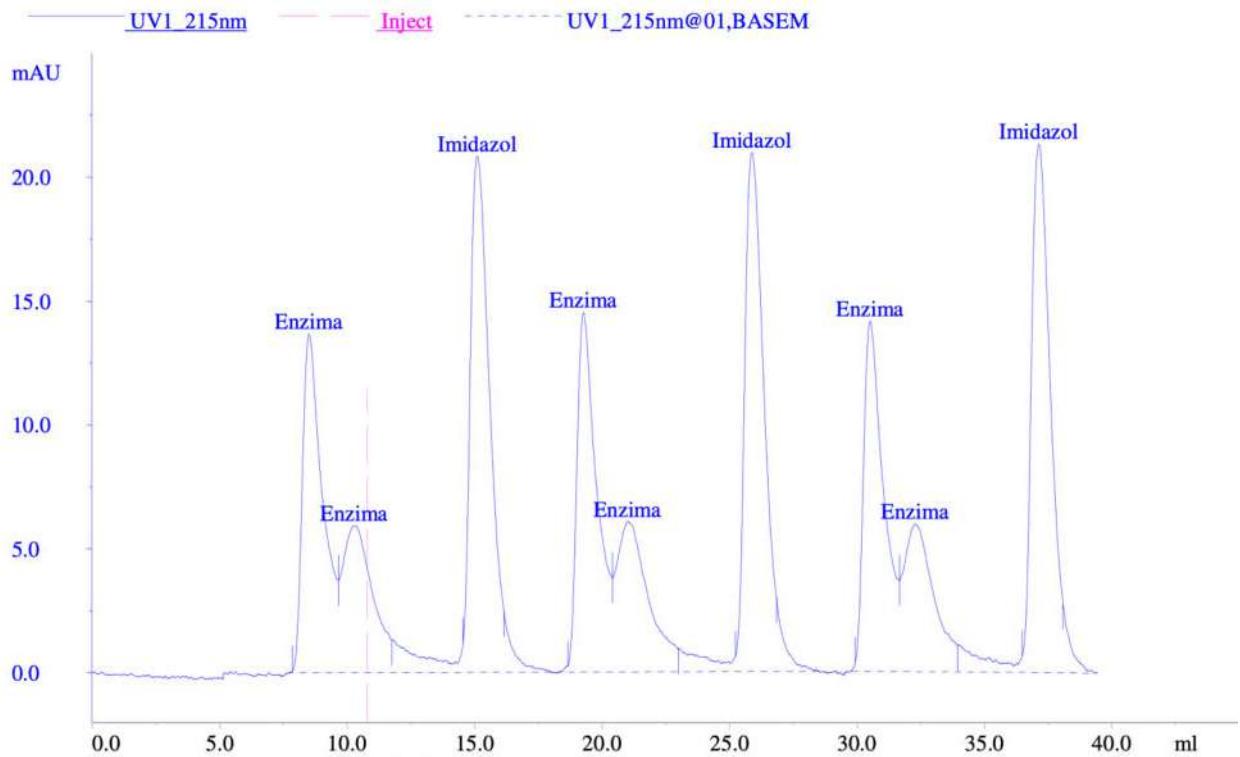


Figura A.13: Triplicata do ponto 0,25 mM da curva de amostra fortificada.

**Figura A.14 – Curva de amostra fortificada, ponto 0,25 mM (2)**

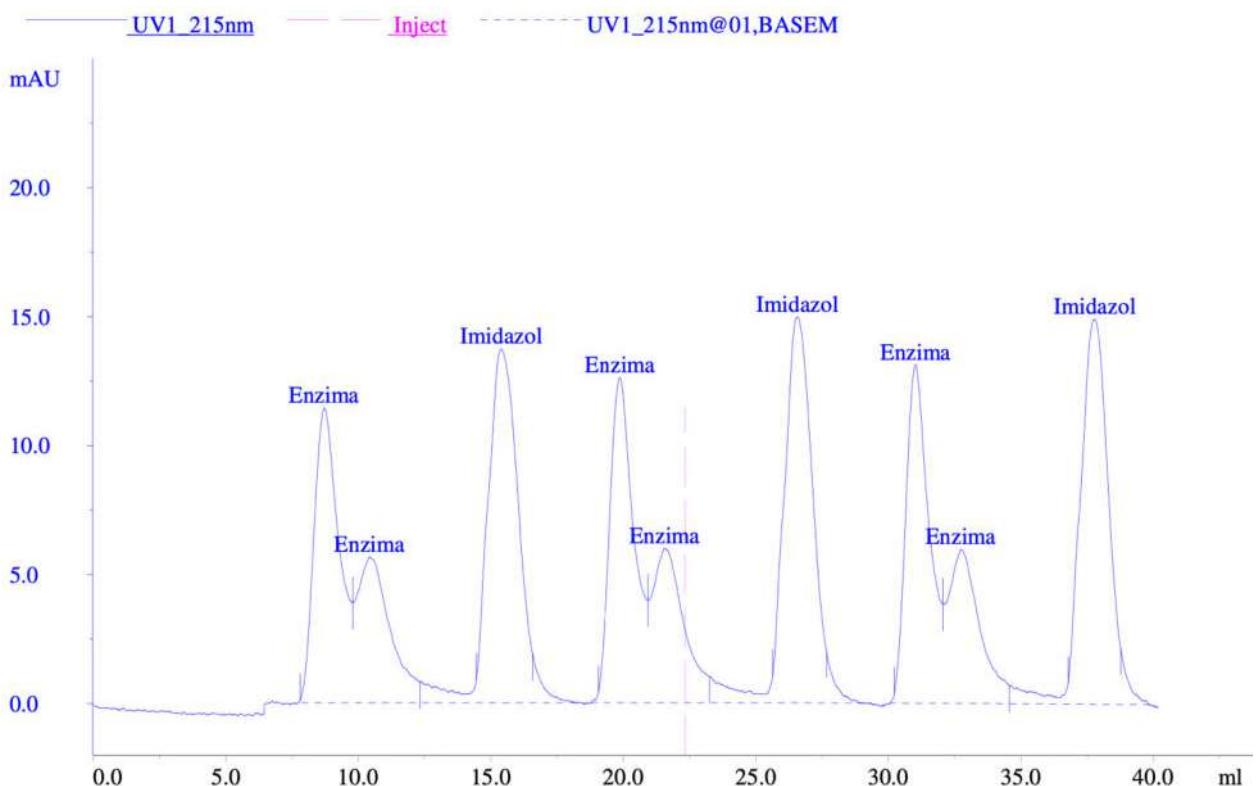


Figura A.14: Triplicata do ponto 0,25 mM da curva de amostra fortificada.

APÊNDICE B – Tabelas dos dados experimentais

**Tabela B.1 – Valores das áreas dos picos de imidazol para as curvas padrão (1) e (2).**

Concentração de imidazol (mM)	Curva padrão (1)			Curva padrão (2)		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
0,05	2,6073	2,6209	2,6055	2,7492	2,5094	2,4027
0,10	5,1571	5,3391	5,1212	5,1177	5,1993	5,0145
0,15	7,5964	7,7119	7,5026	7,5360	7,3314	7,4040
0,20	10,0664	10,1309	9,7434	9,3018	9,9396	9,9922
0,25	12,4662	12,6315	11,8948	12,2353	11,7160	12,3996

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela B.2 – Valores das áreas dos picos de imidazol para as curvas de amostra fortificada (1) e (2).**

Concentração de imidazol (mM)	Curva de amostra fortificada (1)			Curva de amostra fortificada (2)		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
0,00	4,1941	4,2200	4,1597	4,0158	4,2470	4,3274
0,05	6,6046	6,3587	6,3503	6,3379	6,3256	6,1367
0,10	9,2046	9,3437	9,2980	9,2940	9,0454	9,0773
0,15	12,5490	12,6759	12,6082	11,8259	11,9083	10,9565
0,20	15,2968	15,0468	14,9186	14,9129	14,0144	14,7125
0,25	18,0712	17,8631	18,0151	17,3194	17,6882	17,3222

Fonte: Elaboração própria.