

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ALUMÍNIO E OS
CONSTITUINTES DE FORMULAÇÕES
DE ERITROPOETINA EMPREGANDO
HPLC E AAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marlei Veiga dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ALUMÍNIO E OS CONSTITUINTES DE FORMULAÇÕES DE ERITROPOETINA EMPREGANDO HPLC E AAS

por

Marlei Veiga dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação Em Química**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ALUMÍNIO E OS CONSTITUINTES
DE FORMULAÇÕES DE ERITROPOETINA EMPREGANDO
HPLC E AAS**

elaborada por

Marlei Veiga dos Santos

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento
(Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Maria Goreti R. Vale (UFRGS)

Prof. Dr. Sérgio L. Costa Ferreira (UFBA)

Santa Maria, 05 de março de 2009.

Dedico este trabalho

Ao meu avô Eroni da Silva Costa, pelo vazio da
sua ausência percebi quão grande é o
lugar que ocupava no meu coração.
Onde quer que você esteja
continue olhando por mim.

Aos meus pais Valdir e Claci, pelo amor, exemplo,
dedicação e incentivo sempre demonstrado.
E pelas oportunidades que me deram
para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais

Existem pessoas que realmente são importantes em nossa vida, o inexplicável é que só percebemos a dimensão do quão importante elas são quando corremos o risco de perdê-las.

Pai te amo e agradeço a Deus todos os dias a graça de poder te ter comigo.

Existe uma força maior que conduz todas as coisas, esta força se chama Fé.

Mãe obrigada por sempre rezar por mim e por tudo que você significa na minha vida.

Agradeço aos meus melhores amigos Márcia e Marcos, vocês são
pessoas maravilhosas e fundamentais em minha vida,
é um orgulho ter irmãos como vocês.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento, agradeço pela orientação, sabedoria, amizade, disposição na realização deste trabalho e por todas as contribuições para a minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento e ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho pelo esclarecimento de dúvidas e pela amizade.

Aos amigos e colegas Alice Raabe, Ana Paula Lima, Antonio Boli, Cibele Canabarro, Cristiane Spengler, Daiane Dias, Fabiane Stringhini, Fernanda Lima, Juliane Froncheti, Larissa Sabo, Lucas Trindade, Luciana Gobo, Luís Ferraz, Marieli Martini, Maurício Hilgemann, agradeço pela amizade e pelos momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos. Agradeço especialmente a Adriana Berggrav, Alexandre Schneider, Cláudia Carvalho, Cristiane Jost, Denise Bertagnolli, Raquel Stefanello, Sandra Maria Ribeiro e Vanessa Mörschbacher pelos conselhos, amizade, ajuda e incentivo, enfim por me mostrarem como é bom ter amigos com quem se possa contar.

A Carine Ieggli e a Simone Noremborg pelo carinho que sempre demonstraram, pela amizade, pela ajuda no trabalho, pelos conselhos, pelo apoio, enfim por nunca medirem esforços em me ajudar.

A Fernanda Broch e Jéssie Sudati pela grande amizade e por estarem sempre ao meu lado, tenho um carinho imenso por vocês.

Ao Fábio Vieira da Silva Junior pelo carinho, amor, amizade e atenção, você é muito especial para mim, te amo.

Aos meus sobrinhos Eduardo Henrique e Ana Carolina e aos meus cunhados Patrícia Mattiazzi e Ivair de Carli pelo apoio e pela amizade.

A todos os funcionários e professores que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

“A Deus, por ter me acompanhado e permitido a realização deste objetivo, obrigada por este momento!”

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE ALUMÍNIO E OS CONSTITUINTES DE FORMULAÇÕES DE ERITROPOETINA EMPREGANDO HPLC E AAS

Autora: Marlei Veiga dos Santos

Orientadora: Prof^a Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de Março de 2009.

A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína que estimula a eritropoiese (produção das hemáceas) e é usada clinicamente para o tratamento de anemias associadas à insuficiência renal crônica. Formulações de eritropoetina apresentam geralmente uma elevada contaminação por alumínio, que é um metal extremamente tóxico para pacientes com insuficiência renal. Este metal é relacionado a doenças neurológicas e ao comprometimento da estrutura óssea dos pacientes, podendo causar a morte se administrado cronicamente ou em concentrações elevadas aos pacientes. Alguns autores também relacionam o desenvolvimento de doenças degenerativas como a doença de Alzheimer com intoxicação por alumínio.

A presença do alumínio em formulações farmacêuticas destinadas ao tratamento da insuficiência renal e nutrição parenteral é um problema sério devido a toxicidade do alumínio e ao contato direto com o sangue do paciente. Em nosso laboratório, nos dedicamos a estudar a origem do alumínio nestas soluções e de que modo ele interage com os seus constituintes.

No presente trabalho, investigou-se a presença de Al como contaminante em formulações farmacêuticas de eritropoetina consumida por pacientes renais crônicos através do desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico para separação e determinação de proteínas, com posterior coleta de frações e medidas do Al presente por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF

AAS). Como as formas farmacêuticas de comercialização da EPO são em recipientes de vidro com tampa de borracha (frasco-ampola ou seringas), investigou-se a capacidade dos constituintes das formulações de EPO (sais, aminoácidos, uréia e manitol entre outros) em promover a extração do alumínio presente tanto no vidro quanto na borracha. Os ensaios foram realizados considerando o processo de esterilização e o contato das soluções durante o período de armazenamento. Os resultados encontrados demonstraram que a EPO apresenta maior interação com o alumínio que a albumina (o outro constituinte proteico das formulações). Entre os outros constituintes, o ácido cítrico e o citrato apresentaram a maior interação. Para cada constituinte há provavelmente um mecanismo diferenciado de liberação de Al do vidro e da borracha, porém todos os constituintes das formulações de EPO interagiram com o vidro e a borracha, levando a contaminação destas por alumínio.

Como foi determinado o nível de contaminação por alumínio das formulações de eritropoetina comerciais, observou-se que a forma farmacêutica de pó liofilizado apresentou menor contaminação por alumínio devendo, portanto, ser a forma de escolha para os pacientes renais, tão suscetíveis a toxicidade do alumínio.

Palavras chave: eritropoetina recombinante humana, alumínio, interação.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Graduate Pos in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria
Author: Marlei Veiga dos Santos
Advisor: Prof^a Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein which stimulates the erythropoiesis (production of hemaceas) and is clinically used for the treatment of renal anemia. EPO formulations present usually elevated contamination by aluminum. Aluminum is known to participate in the pathogenesis of osteodystrophy and encephalopathy associated with chronic hemodialysis, and has been proposed to be involved in central nervous system degeneration diseases such as Alzheimer's diseases.

In the present work, the presence of Al as contaminant in erythropoietin formulations consumed by chronic renal patients, was investigated by developing and optimizing a chromatographic method for separation and determination of proteins, with subsequent collection of fractions and measured of the Al present by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). As the commercialization of pharmaceutical forms of EPO are in glass containers with rubber cap (bottle, vial or syringe), it was investigated the ability of the constituents of EPO formulations (salts, amino acids, urea, and mannitol among others) to promote the extraction of aluminum present in both glass and rubber. The tests were performed considering the process of sterilization and the contact of the solutions during storage. The results demonstrated that the interaction of EPO with aluminum is higher than that of albumin (the other proteic constituent). Among the other constituents, citric acid and citrate presented the highest interaction. For each constituent there is probably a different mechanism for the release of aluminum from glass and rubber, but all constituent of EPO formulations interacted with glass and rubber packaging, leading to their contamination by aluminum.

As the level of contamination by aluminum in commercial formulations of erythropoietin was determined, and it was observed that the lyophilized powder presented the lowest contamination by aluminum, this form must be the choice for renal patients, due to the susceptibility of these patients to aluminum toxicity.

Keywords: recombinant human erythropoietin, aluminum, interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura primária da eritropoetina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto que estão unindo as cisteínas 29 e 33 e as cisteínas 6 e 161. Sítios de N-glicosilação estão presentes nas asparginas 24, 38 e 83 e um sítio de O-glicosilação está presente na serina 126 [GILG et al., 1996]..... 23
- Figura 2: Estrutura terciária da EPO [BOISSEL, et al., 1993]..... 23
- Figura 3: Seqüência de aminoácidos formando a estrutura da eritropoetina. Ala=alanina, Pro=prolina, Arg=arginina, Leu=leucina, Ile=isoleucina, Cis=cisteína, Asp=ácido aspártico, Ser=serina, Val=valina, Glu=ácido glutâmico, Tir=tirosina, His=histidina, Lis=lisina, Asp=asparagina, Tre=treonina, Gli=glicina, Trp=triptofano, Gln=glutamina, Fen=fenilalanina e Met=metionina..... 26
- Figura 4: Sistema de HPLC usado para separação e quantificação de albumina e eritropoetina e também para a coleta de frações para medidas por GF AAS..... 47
- Figura 5: Representação gráfica da curva padrão de albumina obtida através de HPLC (n=3)..... 56
- Figura 6: Representação gráfica da curva padrão de eritropoetina obtida através de HPLC (n=3)..... 56
- Figura 7: Al extraído do frasco-ampola pelo medicamento *Hemax*[®] em 35 dias. 70
- Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPLC (rhEPO=eritropoetina humana recombinante e HSA=albumina do soro humano): a) *Alfaepoetina*[®] b) *Eritropoetina*[®] c) *Recormon*[®] d) Eritropoetina recombinante (2° padrão internacional 2003) NIBSC. Para diluições de 1/10 dos medicamentos. Condições cromatográficas: Coluna BioSep-SEC S2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm de d.i.;5µm); fase móvel: acetato de sódio 40mM pH 7,30; vazão 1mL.min⁻¹; volume injetado: 100µL..... 72

Figura 9:	Alumínio determinado nas frações coletadas para <i>Alfaepoetina</i> [®] a) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10; b) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L ⁻¹ de Al a 4°C por 16h; c) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L ⁻¹ de Al a 37°C por 16h.....	74
Figura 10:	Alumínio determinado nas frações coletadas para Eritropoetina [®] a) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10; b) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L ⁻¹ de Al a 4°C por 16h; c) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L ⁻¹ de Al a 37°C por 16h.....	75
Figura 11:	Alumínio determinado nas frações obtidas nos tempo de retenção da albumina humana e rhEPO para <i>Alfaepoetina</i> [®] e <i>Recormon</i> [®] a) Alfaepoetina: Al que interagiu com a albumina humana; b) Alfaepoetina: Al que interagiu com a EPOrh c) Recormon: Al que interagiu com a rhEPO.....	77
Figura 12:	Alumínio determinado nas frações obtidas nos tempo de retenção da rhEPO para <i>Alfaepoetina</i> [®] : Al que interagiu com a rhEPO em um período de incubação de 16 horas a 4° e 37°C.....	78
Figura 13:	Al extraído do vidro e da tampa antes e depois do processo de esterilização pelas amostras de água.....	80
Figura 14:	Al extraído pelas soluções de aminoácidos e proteínas antes e após a esterilização.....	81
Figura 15:	Al extraído pelas soluções de outros excipientes antes e após a esterilização.....	83
Figura 16:	Al extraído pelos constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana em 90 dias: (■) alumínio extraído do vidro, (▲) alumínio extraído da tampa de borracha.....	84
Figura 17:	Al extraído pelo EDTA em 90 dias: (■) alumínio extraído do vidro, (▲) alumínio extraído da tampa de borracha.....	89
Figura 18:	Porcentagem de alumínio extraído pelos constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana: a) média de Al extraído do vidro em 90 dias, b) média de Al extraído da tampa em 90dias.....	91

Figura 19: Alumínio medido nas amostras e no padrão de rhEPO(24,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) adicionadas de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Al. a) ultrafiltração em membrana de 10kDa, b) ultrafiltração em membrana de 50kDa. Onde o Al total corresponde à amostra adicionada de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Al sem a ultrafiltração..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Reagentes utilizados.....	43
Tabela 2:	Soluções de eritropoetina e excipientes dos medicamentos.....	44
Tabela 3:	Descrição do programa de temperatura para AI determinado por GF AAS.....	46
Tabela 4:	Condições cromatográficas otimizadas para a validação.....	48
Tabela 5:	Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão de albumina através de HPLC.....	55
Tabela 6:	Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão de eritropoetina através de HPLC.....	55
Tabela 7:	Limites de detecção e quantificação da albumina a eritropoetina.....	57
Tabela 8:	Resultados obtidos para a precisão intra-dia na análise de albumina e eritropoetina nas formulações farmacêuticas.....	59
Tabela 9:	Resultados obtidos para a precisão inter-dia na análise de albumina e eritropoetina nas formulações farmacêuticas em dias diferentes.....	59
Tabela 10:	Resultados obtidos no teste de recuperação de albumina em formulações farmacêuticas.....	61
Tabela 11:	Resultados obtidos no teste de recuperação de eritropoetina em formulações farmacêuticas.....	61
Tabela 12:	Avaliação da robustez do método de HPLC através da determinação de eritropoetina e albumina em formulações farmacêuticas alterando o comprimento de onda de detecção.....	62
Tabela 13:	Avaliação da robustez do método de HPLC através da determinação de eritropoetina e albumina em formulações farmacêuticas alterando a concentração da fase móvel.....	63
Tabela 14:	Resultados obtidos para a determinação de rhEPO e albumina humana em amostras comerciais através de HPLC.....	64
Tabela 15:	Formas farmacêuticas, apresentações e composições da eritropoetina humana recombinante (rhEPO).....	65
Tabela 16:	Teor de AI presentes em amostras comerciais armazenadas em vidro, determinado por GF AAS.....	69

Tabela 17: Alumínio ligado à coluna de exclusão molecular: coluna (16,0cm x 1,5 cm) empacotada com várias SEC, sendo o alumínio removido por lavagem com tampão contendo DFO. Foram injetadas quantidades iguais de cloreto de alumínio e as recuperações foram determinadas por GF AAS [FAVARATO et al.,1992].....	73
Tabela 18: Distribuição do alumínio determinado nas frações coletadas dos medicamentos <i>Alfaepoetina</i> [®] e <i>Eritropoetina</i> [®]	76
Tabela19: Valores de pKas para os aminoácidos em estudo.....	82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

λ	Comprimento de onda
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BHK	Célula de rim de hamster jovem
CE	Eletroforese capilar
CHO	Célula de ovário de hamster chinês
COI	Comitê olímpico internacional
CV%	Coeficiente de Variação
DFO	Deferroxamina
e.p.m	Erro padrão da média
EPO	Eritropoetina
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica forno de grafite
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	Albumina do soro humano
ICH	Conferência internacional de harmonização
kDa	Kilo Dalton
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
pI	Ponto isolelétrico
r	Coeficiente de correlação linear
rhEPO	Eritropoetina recombinante humana
RSD	Desvio padrão relativo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SQR	Substância química de referência
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.2.1 Eritropoetina recombinante humana.....	22
2.2.2 Formas comerciais de rhEPO	28
2.2.3 Métodos de análise quantitativa e qualitativa de rhEPO	30
2.3 Tratamento da anemia na insuficiência renal	33
2.4 Contaminação de medicamentos por metais	35
2.5 Toxicidade e efeitos dos metais na saúde humana	37
2.5.1 O Alumínio no organismo humano.....	38
2.5.2 Distribuição do alumínio.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Instrumentação.....	41
3.2 Reagentes e Soluções	42
3.3 Controle da contaminação	45
3.4 Procedimentos analíticos.....	45
3.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica Forno de Grafite-GF AAS	45
3.4.1.1 Condições utilizadas na determinação do alumínio	45
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	46
3.4.2.1 Sistema Cromatográfico	46
3.4.2.2 Validação do Método Cromatográfico	47
3.4.2.2.1 Linearidade	48
3.4.2.2.2 Limite de detecção	48
3.4.2.2.3 Limite de quantificação.....	49
3.4.2.2.4 Precisão intra-dia ou repetitividade.....	49
3.4.2.2.5 Precisão inter-dia ou precisão intermediária	49
3.4.2.2.6 Exatidão	49
3.4.2.2.7 Robustez	50
3.5 Quantificação de eritropoetina e albumina	50
3.6 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas presentes no medicamento por meio de coletas de frações.....	50

3.7 Avaliação da interação de alumínio com eritropoetina e excipientes do medicamento (ensaio de esterilização e armazenagem)	51
3.8 Ultrafiltração	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Validação do método cromatográfico	53
4.1.2 Processo de validação	53
4.1.2.1 Linearidade	54
4.1.2.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	57
4.1.2.3 Precisão	58
4.1.2.4 Exatidão	60
4.1.2.5 Robustez	62
4.1.2.6 Aplicação do método: Quantificação de eritropoetina recombinante humana e albumina humana	63
4.2 Estudo da interação entre alumínio e os constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana	64
4.2.1 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas constituintes do medicamento por meio de coletas de frações após separação cromatográfica	70
4.2.2 Contribuição dos diferentes constituintes na contaminação por alumínio de formulações farmacêuticas de eritropoetina recombinante humana.....	79
4.2.2.1 Influência da esterilização na extração de alumínio da embalagem	80
4.2.2.2 Avaliação da interação do alumínio com eritropoetina e excipientes do medicamento por um período de 90 dias (ensaio de armazenamento).....	84
4.2.3 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas constituintes do medicamento por meio de ultrafiltração	92
5. CONCLUSÕES	95
6. REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

A contaminação de pacientes com insuficiência renal por alumínio pode estar associada à presença deste na medicação empregada, uma vez que o alumínio pode ser absorvido pelo organismo do paciente. O nível de contaminação através da medicação, nestes casos, dependerá da qualidade e da frequência da medicação utilizada no tratamento.

O problema aqui está relacionado a uma capacidade reduzida dos pacientes com insuficiência renal de eliminar espécies tóxicas e indesejáveis ao metabolismo humano. Estudos demonstram que doenças neurológicas e o comprometimento da estrutura óssea dos pacientes estão relacionados ao acúmulo de alumínio no organismo [LIMA, 1992].

O rim produz um hormônio chamado eritropoetina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos do sangue, o mau funcionamento dos rins diminui a formação desse hormônio, causando anemia. Sendo assim, a anemia é freqüentemente observada em pacientes com insuficiência renal e é considerada a consequência mais negativa do tratamento destes pacientes. Juntamente com a hipertensão, é a causa principal de problemas cardiovasculares em pacientes dialisados e transplantados [LOCATELLI et al., 2001; LOCATELLI et al., 2003].

A eritropoetina recombinante humana (rhEPO) é um antianêmico renal utilizado no tratamento da anemia associada a insuficiência ou doença renal crônica causada pela produção diminuída de eritropoetina, hormônio endógeno. A rhEPO é uma glicoproteína produzida por tecnologia do DNA recombinante, contém 165 aminoácidos em seqüência idêntica à da eritropoetina humana e sua atividade biológica é igual à do hormônio endógeno. A rhEPO é administrada ao paciente via intravenosa ou subcutânea na dose mínima de 50 UI.kg⁻¹ três vezes por semana [KOROLKOVAS,1999].

No mercado farmacêutico existem várias formulações de rhEPO e podem ser apresentadas em pó liofilizado ou solução injetável no qual cada frasco-ampola pode conter por mililitro de solução dosagens de 1.000 UI, 2.000 UI, 3.000 UI, 4.000 UI ou 10.000 UI de eritropoetina recombinante humana, além de componentes não ativos como, por exemplo, glicina, albumina humana, citrato de sódio, fosfato de sódio

dibásico, cloreto de sódio, entre outros, dependendo da forma de apresentação do medicamento.

No presente trabalho, pesquisou-se a presença de alumínio como contaminante em formulações de eritropoetina (rhEPO), através do desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico para separação e determinação de proteínas, com posterior coleta de frações e medidas por GF AAS. Também analisou-se a contribuição de cada constituinte das formulações de rhEPO na contaminação por alumínio do medicamento .

Como as formas farmacêuticas de comercialização da rhEPO são em recipientes de vidro com tampa de borracha (frasco-ampola ou seringas), investigou-se a capacidade dos constituintes das formulações de rhEPO em promover a extração do alumínio presente tanto no vidro quanto na borracha. Os ensaios foram realizados considerando o processo de esterilização (aquecimento) e o contato das soluções durante o período de armazenamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biotecnologia

Entre 1950 e 1980, ocorreu um expressivo desenvolvimento de conhecimentos relacionados à cinética de crescimento celular e à de reações catalisadas por enzimas; aos fenômenos de transporte que têm relevância em bioprocessos e à recuperação, separação e purificação de bioprodutos. Com isso, nos últimos anos, ocorreu um acentuado desenvolvimento na área da biotecnologia, que se baseia em processos tecnológicos que permitem a utilização de material biológico (plantas e animais) para a obtenção de produtos de interesse para o homem. Este desenvolvimento teve como consequência, o aparecimento de novos processos industriais [NORTE, 2007].

2.2 Biofármacos

Os avanços no conhecimento da base molecular das doenças, ao longo do século XX, permitiram identificar um grande número de polipeptídeos de potencial terapêutico. Entretanto, devido às baixas concentrações em que se encontram em organismos sadios, tornava-se, na maioria dos casos, inviável obtê-los com base na extração direta a partir de tecidos ou de doadores. Todavia, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, na década de 1970, forneceu as ferramentas necessárias para que se pudessem produzir proteínas humanas, utilizando outras células como hospedeiras. Tornava-se possível, portanto, produzir proteínas terapêuticas com alta pureza e em largas quantidades. Entretanto, como a maioria das proteínas de uso terapêutico apresenta estrutura complexa e se mostra geralmente glicosilada, ainda se enfrentava o desafio de produzir as proteínas com conformação e padrão de glicosilação adequados [NORTE, 2007].

Inicialmente, tentou-se produzir essas proteínas em bactérias e leveduras. Contudo, os resultados demonstraram que algumas possuíam estruturas muito complexas que dificultavam sua produção por meio destes microorganismos. Assim, iniciou-se a produção em células animais cultivadas *in vitro*, tendo-se obtido resultados extremamente satisfatórios, por exemplo, através do uso de células da linhagem CHO (células de ovário de hamster chinês). Além disso, as células CHO

apresentam semelhança de suas enzimas de glicosilação com as enzimas das linhagens celulares humanas, ponto importante para a produção de biofármacos, uma vez que as proteínas recombinantes apresentam padrão de glicosilação semelhante ao das proteínas nativas. A eritropoetina recombinante humana (rhEPO) é um exemplo de biofármaco disponível comercialmente [NORTE, 2007].

2.2.1 Eritropoetina recombinante humana

A eritropoetina é um hormônio glicoprotéico produzido no rim de adultos e fígado fetal ou neonatal de mamíferos, é o principal hormônio atuante na regulação e manutenção de células eritróides progenitoras de eritrócitos, estimulando a diferenciação de células tronco da medula óssea nos estágios iniciais da eritropoiese, acelerando a proliferação e maturação de células terminalmente diferenciadas em eritrócitos. [GOLDWASSER et al., 1974; DALLE et al., 2001].

O gene da eritropoetina humana (EPO) foi isolado e caracterizado em 1985 [LIN et al., 1985; JACOBS et al., 1985].

A EPO apresenta a fórmula química $C_{809}H_{1301}N_{229}O_{240}S_5$, sua massa molar está na faixa de 35 kDa, dos quais 60% são correspondentes a uma cadeia polipeptídica única com 165 aminoácidos, de aproximadamente 18 kDa contendo duas pontes dissulfeto intramoleculares nas posições (Cis^{7,161} e Cis^{29,33}). Na figura 1 estão representadas a estrutura primária da EPO bem como as pontes dissulfeto e os locais de inserção das cadeias glicídicas [GILG et al., 1996]. O restante da massa da molécula de 40% é decorrente da presença dos carboidratos componentes de sua estrutura glicosilada [GOLWASSER et al., 1974; LAI et al., 1986; TRAN et al., 1991; CHOI et al., 1996; YU et al., 2005]. Sua estrutura terciária é globular caracterizada por 4 hélices α (A, B, C e D) e 2 folhas β anti-paralelas. A estrutura tridimensional da EPO esta representada na figura 2 [BOISSEL, et al., 1993].

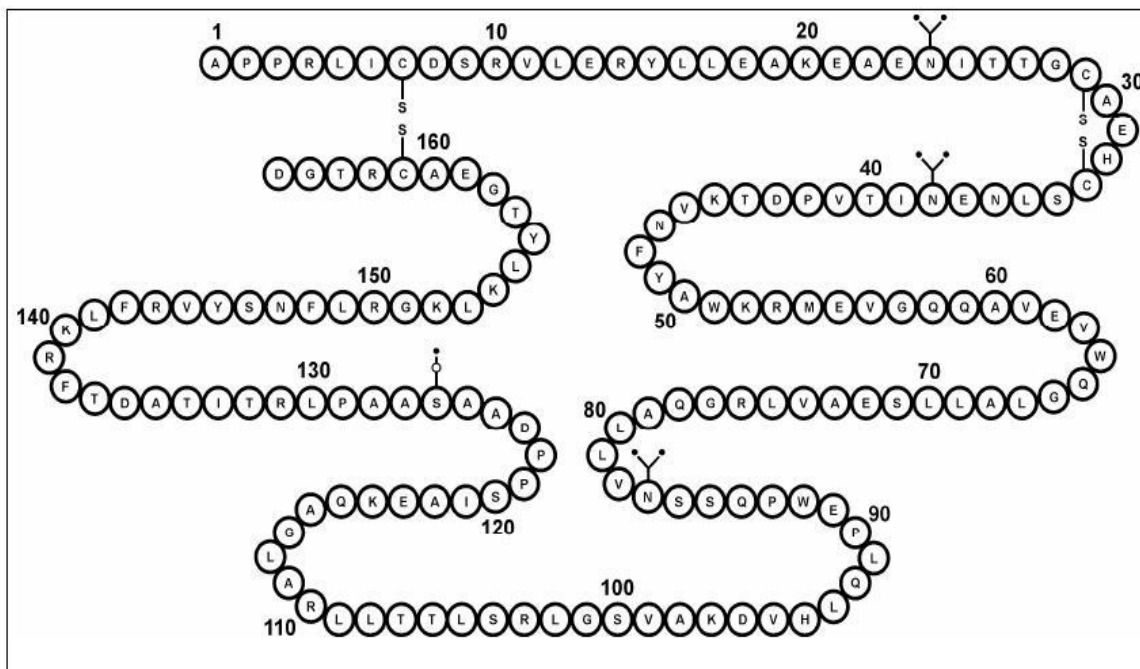


Figura 1: Estrutura primária da eritropoetina humana recombinante com suas duas pontes dissulfeto que estão unindo as cisteínas 29 e 33 e as cisteínas 6 e 161. Sítios de N-glicosilação estão presentes nas asparginas 24, 38 e 83 e um sítio de O-glicosilação está presente na serina 126 [GILG et al., 1996]

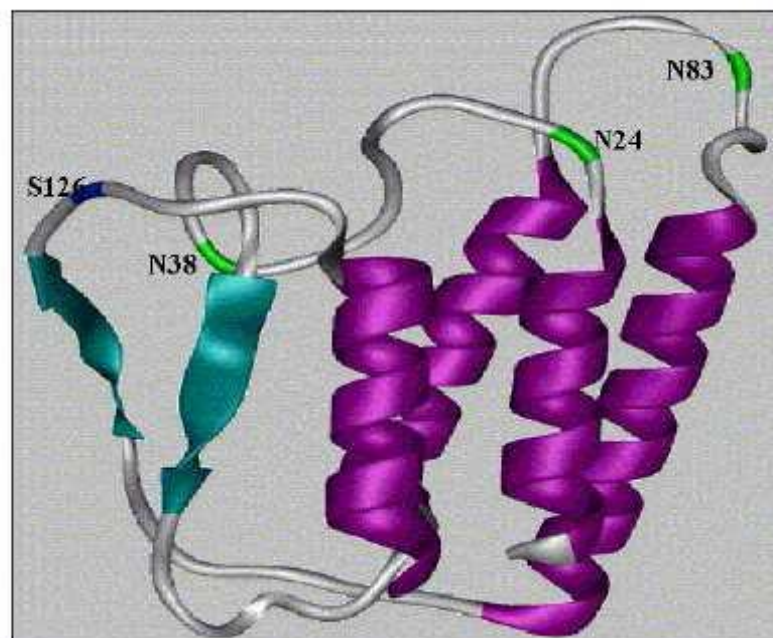


Figura 2: Estrutura terciária da EPO [BOISSEL, et al., 1993]

A eritropoetina humana endógena bem como a recombinante, contêm três cadeias de açúcares ligados em três sítios de glicosilação na Asparagina^{24,38,83}, e um sítio de O-glicosilação na Serina¹²⁶. Nas cadeias de carboidratos N-ligados os oligossacarídeos podem conter dois, três ou quatro ramificações, cada qual tipicamente terminadas com uma molécula ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) carregada negativamente, como exceção deste, que é um glicídeo com 11 carbonos, todas as outras moléculas de açúcares da eritropoetina são neutras. Similarmente, a cadeia O-ligada pode conter duas moléculas de ácido siálico ou nenhuma. Considerando que cada um dos três oligossacarídeos N-ligados pode possuir até quatro resíduos de ácido siálico e a cadeia O-ligada única pode possuir dois, a molécula de eritropoetina poderá ter o máximo de 14 moléculas de ácido siálico na extremidade de suas cadeias. Por essa razão, devido a variabilidade da estrutura e do número de moléculas de ácido siálico, a carga negativa líquida da molécula pode variar [BROWNE et al., 1986; EGRIE et al., 1986; SASAKI et al., 1987].

Além de conferir carga negativa à molécula, que apresenta ponto isoelétrico entre 4,5 a 5,0, a presença de resíduos de ácido siálico nas extremidades das cadeias glicídicas são necessários para que o hormônio atinja seus sítios alvo, uma vez que a sua ausência expõe moléculas de galactose das cadeias de açúcares, propiciando seu reconhecimento por receptores hepáticos levando à metabolização e à excreção das moléculas [BOISSEL, et al., 1993].

Assim como ocorre em proteínas glicosiladas em geral, a EPO é encontrada como uma mistura de isoformas, relacionadas à fração variável de carboidratos presente na proteína. Estudos revelaram que essa heterogeneidade está associada à ausência (ou presença) de resíduos de ácido siálico com variado grau de acetilação. E é esse grau de sialilação das cadeias polissacarídicas que influenciará fortemente a mobilidade eletroforética e o ponto isoelétrico da molécula [GOKANA et al., 1997].

A glicosilação da eritropoetina é um processo pós-tradução que é influenciado pelo tipo de célula na qual a EPO é expressa, por fatores fisiológicos e condições de cultura [RADEMACHER et al., 1988]. A composição pode ser posteriormente afetada pela seletividade de processos de isolamento usados para purificação [STORRING, 1992].

Embora a eritropoetina não glicosilada tenha atividade *in vitro*, ela não apresenta nenhuma atividade *in vivo*, devido à sua baixa vida média na circulação

humana. Conseqüentemente, a eritropoetina recombinante para uso terapêutico deve ser fabricada em células de mamíferos, que proporcionam um padrão de glicosilação semelhante ao da glicoproteína humana nativa [DORDAL et al., 1985].

A necessidade de uma fonte renovável de eritropoetina para o tratamento da anemia causada por insuficiência renal crônica, foi reconhecida em 1960, mas somente na década de 1980, o gene da eritropoetina humana foi clonado e expresso tanto em células de ovário de hamster chinês (CHO) quanto em células de rim de hamster neonato (BHK) produzindo a eritropoetina recombinante humana (rhEPO). A molécula recombinante apresenta estrutura peptídica idêntica ao hormônio natural, como pode ser observado na figura 3. A atividade biológica da rhEPO corretamente glicosilada é equivalente à do hormônio endógeno [DORDAL, 1985; LIN et al., 1985; EDER et al.; 2002]. Porém foram observadas diferenças significativas entre a composição de isoformas e as propriedades biológicas das rhEPOs [CHOI et al.,1996; LASNE & CEAURRIZ, 2000].

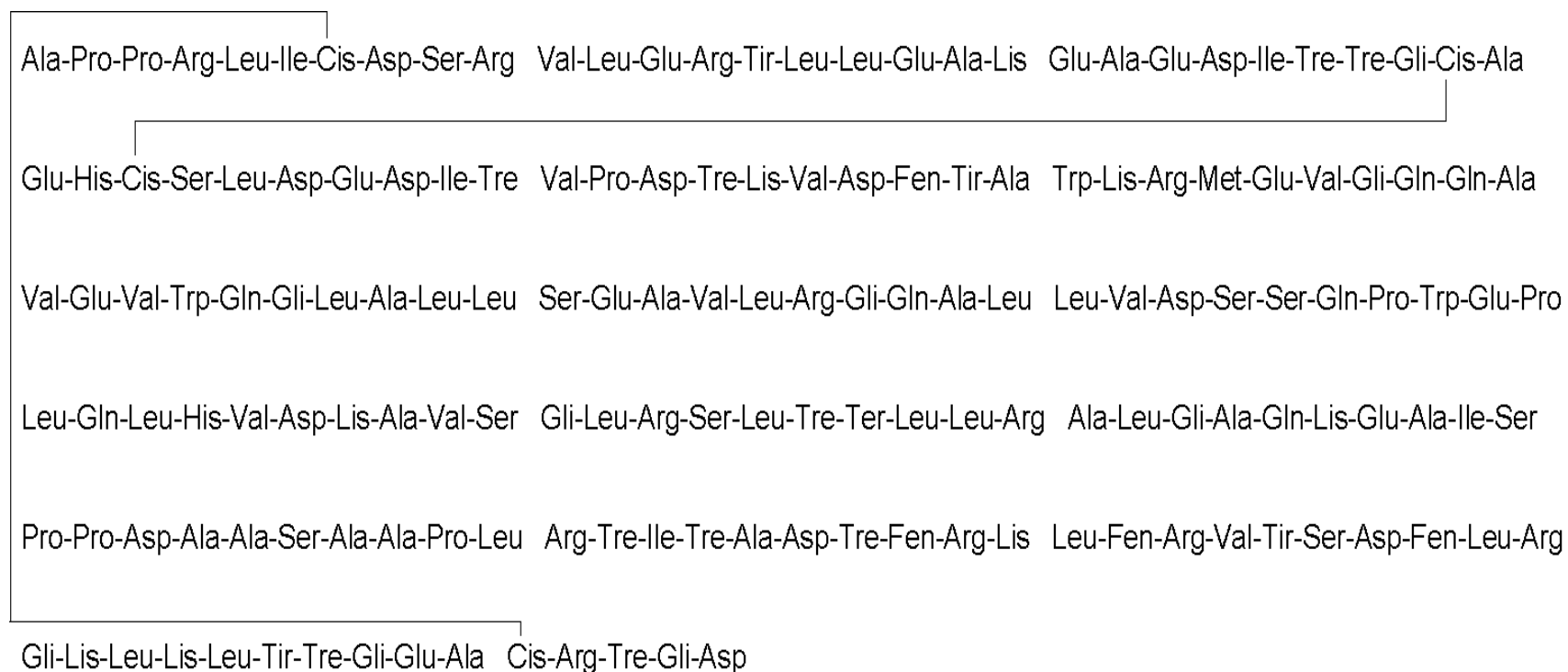


Figura 3: Seqüência de aminoácidos formando a estrutura da eritropoetina. Ala=alanina, Pro=prolina, Arg=arginina, Leu=leucina, Ile=isoleucina, Cis=cisteína, Asp=ácido aspártico, Ser=serina, Val=valina, Glu=ácido glutâmico, Tir=tirosina, His=histidina, Lis=lisina, Asp=asparagina, Tre=treonina, Gli=glicina, Trp=triptofano, Gln=glutamina, Fen=fenilalanina e Met=metionina

Os estudos realizados com a rhEPO demonstraram que há uma relação direta entre o conteúdo de ácido siálico ligado a molécula de carboidrato, a meia vida biológica no soro e a atividade biológica *in vivo*, mas inversa com a afinidade com o receptor. Essas observações levaram a hipótese de que, aumentando o teor de carboidratos e, conseqüentemente, de ácido siálico, relativamente ao encontrado naturalmente, poderia originar-se uma molécula com atividade biológica maior [EGRIE et al., 1997]. Sendo assim, foram desenvolvidos análogos hiperglicosados de rhEPO, com a finalidade de demonstrar que com mais carboidratos a nova molécula poderia apresentar maior atividade biológica. A darbepoetina alfa foi, portanto, planejada de modo a conter cinco cadeias de carboidratos N-ligadas (duas a mais que a rhEPO) e foi submetida a estudos clínicos como uma nova proteína estimuladora da eritropoiese. Devido ao seu conteúdo maior em ácido siálico, é bioquimicamente diferente da rhEPO, com peso molecular maior e maior potência *in vivo*, podendo ser administrada menos frequentemente para obter a mesma resposta biológica. O produto foi submetido a experimentos clínicos, visando a prevenção e tratamento de anemia [EGRIE & BROWNE, 2001]. O perfil farmacocinético da darbepoetina alfa é diferente da rhEPO, pois o tempo de eliminação é mais longo, a meia-vida na circulação é maior, prolongando assim, a atividade eritropoética [MACDOUGALL, 2002].

A rhEPO é eficaz no tratamento de anemias, em especial das anemias associadas à resposta eritropoiética deficiente. É amplamente utilizada para o tratamento de anemias de pacientes com falência renal pré e sob-diálise, anemias causadas em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia ou a anemias com zidovudina na infecção pelo HIV e artrite reumatóide. Também é usada em anemias no pré-operatório para aumentar a produção de hemácias, permitindo o armazenamento de volumes maiores de sangue para a transfusão autóloga. Pode ser administrada durante a cirurgia, para manter nível maior de hemácias no período pós-operatório imediato [CHOI et al., 1996; CHEUNG et al., 1998]. Atualmente estão sendo estudadas novas aplicações da rhEPO, na redução da inflamação associada a isquemia em casos de lesão cerebral, da coluna vertebral, insuficiência renal aguda e infarto do miocárdio [SHARPLES et al., 2006].

Devido ao seu potencial terapêutico de estimular a produção de hemácias e, conseqüentemente, aumentar o aporte de oxigênio para os tecidos a rhEPO pode ser utilizada como droga de abuso para aumentar a performance de atletas. A

utilização da rhEPO no esporte foi proibida pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) a partir de 1987 [CHOI et al., 1996]. Visando preservar a saúde do indivíduo e a ética esportiva, o COI e outras federações esportivas consideraram o uso da rhEPO e seus análogos como casos de *doping* sanguíneo por administração exógena de hormônio peptídico [BENTO et al., 2003]. O emprego incorreto deste hormônio é perigoso, pois a rhEPO também provoca o aumento de viscosidade sanguínea e da resistência vascular periférica, que resultam em aumento da pressão arterial, podendo causar parada cardíaca ou morte dependendo da dose. A análise de rhEPO em sangue e especialmente em urina tornou-se de grande interesse para o controle de drogas de abuso em eventos esportivos [HERNÁNDEZ & HERNÁNDEZ 1995].

2.2.2 Formas comerciais de rhEPO

Existem cinco formas de rhEPOs, alfa, beta, epsilon, gama e omega, demoninação utilizada para designar as preparações que diferem na natureza e composição das estruturas glicídicas, sendo usadas em forma terapêutica a rhEPO alfa e beta [DBC,1996; DEF, 2006]. Tal classificação depende do método de fabricação, sendo as duas primeiras sintetizadas a partir de células CHO. Apesar das células CHO e BHK glicosilarem proteínas de modo semelhante ao que ocorre na célula humana, algumas regiões de carboidratos não são sintetizadas por estas células devido a ausência de enzimas açúcar-transferases específicas. Enquanto a síntese das cadeias polissacarídicas são processadas e ligadas por uma série de reações enzimáticas [SKIBELI et al., 2001].

Comparações efetuadas entre diversos lotes de rhEPO alfa e beta evidenciaram atividade biológica distinta devido a diferentes valores encontrados para razões de potência relativa *in vivo/in vitro* para cada uma destas formas, sendo tais valores mais elevados para a rhEPO beta do que para alfa [STORRING et al., 1998]. Estas formas de rhEPOs são compostas por diversos tipos de isoformas, devido a micro-heterogeneidade na estrutura do hormônio provocada pela variação na composição polissacarídica [CHOI et al., 1996; STORRING et al., 1998; SKIBELI et al., 2001].

As isoformas da rhEPO alfa e beta diferem parcialmente em sua composição quando analisadas pela técnica de focalização isoelétrica (IEF). Através desta

técnica, foi possível visualizar não só maior número de bandas referentes as isoformas da rhEPO beta como uma região de bandas extras em valores de pH mais elevados, conferindo-lhes características mais básicas, suas isoformas estão distribuídas na faixa do ponto isoelétrico (pI) de 4,42 a 5,11, porém a rhEPO alfa apresentou cinco componentes distintos com os mais básicos e ácidos presentes em menores concentrações, e os lotes de rhEPO beta seis a sete componentes diferentes. Cinco destes componentes estavam na mesma posição da rhEPO alfa, com maior proporção de isoformas básicas. A densiometria confirmou que a proporção de isoformas mais básicas era significativamente maior na rhEPO beta do que na alfa. Não há registros que a rhEPO alfa difere da beta em eficácia clínica, porém diferenças entre elas em alguns métodos analíticos poderiam justificar padrões internacionais diferentes para os dois tipos [STORRING et.al., 1998; LANE & CEARRIZ,2000].

Além de variações de atividade biológica e composição estrutural, as duas formas de rhEPO possuem perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos distintos, sendo o volume de distribuição 7,7% e a meia vida de eliminação 20% superiores para beta em relação a alfa. Em administrações subcutâneas, observa-se atraso na absorção da rhEPO beta em relação a alfa, encontrando-se valores mais baixos para concentrações plasmáticas da forma beta, durante as primeiras 18 horas de administração, entretanto, no intervalo de tempo de 48 a 66 horas os valores da beta superam a alfa [BENTO et al., 2003].

Relatos de voluntários com relação a sensação de dor ao fazerem uso da forma alfa (56%), quando comparados a forma beta (5,6%), após a aplicação subcutânea [BENTO et al., 2003]. Pacientes em hemodiálise sob tratamento com rhEPO mostram reação semelhante em estudo subjetivo mediante estimulação de uma faixa numérica de intensidade de dor sentida. Como explicação para comportamentos tão distintos entre as formas, sugere-se que os excipientes que constituem a formulação de cada medicamento, ou o próprio tipo de rhEPO em si, seriam responsáveis pelas diferenças de reação dolorosa [VANHOLDER et al.; 1990].

As formulações de eritropoetina disponíveis comercialmente diferem nos excipientes adicionados para conferir a estabilização da molécula de rhEPO, isto resulta em variações entre as preparações, na armazenagem e no manuseio requerido. Outra diferença entre as formulações de rhEPO é o próprio composto

ativo, pois diferenças na estrutura das cadeias de carboidratos presentes na glicoproteína são resultado de diferentes processos de manufatura. A diferença na estrutura de carboidratos e a composição de isoformas tem grande efeito não somente sobre as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas da rhEPO, mas também sobre a estabilidade e solubilidade uma vez que sem os carboidratos a proteína torna-se insolúvel e forma agregados [HASELBECK, 2003].

2.2.3 Métodos de análise quantitativa e qualitativa de rhEPO

As pesquisas com biofármacos atingiram um estágio no qual a atividade biológica de algumas proteínas pode ser correlacionada com métodos físico-químicos [MIRE-SLUIS et al., 1996; DALMORA et al., 2006]. Porém, o desenvolvimento de métodos físico-químicos para a determinação de rhEPO em formulações farmacêuticas podem apresentar dificuldades devido a baixa concentração da glicoproteína na presença de quantidades significativas de excipientes, adicionados para prevenir a adsorção da proteína nas paredes dos recipientes, aumentando desta forma, a estabilidade do produto durante o armazenamento. Os problemas são maiores ainda, quando os excipientes são também proteínas, tais como, a albumina do soro humano (HSA), que não pode ser considerada quimicamente homogênea, pois geralmente é obtida de plasma humano de um grande número de doadores [BIETLOT & GIRARD, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2006].

Entre os métodos descritos pela literatura para análise qualitativa e quantitativa de rhEPO, destacam-se a eletroforese capilar em gel policrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), frequentemente combinada com transferência e imunodeteção [SASAKI et al., 1987; FUKUDA et al.,1989], focalização isoelétrica (IEF) [BRISTOW, 1997; GOKANA et al.,1997; STORRING et al., 1998], eletroforese capilar [WATSON & YAO, 1993; BIETLOT & GIRARD, 1997; CIFUENTES et al., 1999; LÓPEZ-SOTO-YARRITU et al., 2002.; EP., 2005; LARA-QUINTANAR et al.,2006], eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de massa [SANZ-NEBOT et al., 2003; NEUSÜß et al.,2005], cromatografia líquida de exclusão molecular [ENDO et al., 1992; TSUJI, 1994; DEPAOLIS et al., 1995; DERBY et al., 1996; GUNTURI et al.,2007], cromatografia líquida por troca iônica [LUYKX et al., 2005]. O ensaio

biológico, com dose única [BRISTOW, 1997; EP., 2005] e com dose múltipla em camundongos normocitêmicos ou policitêmicos [RAMOS et al., 2003].

Tran et al. utilizaram a eletroforese capilar como alternativa a IEF, para a separação de glicofomas de rhEPO. Pesquisaram o efeito do pH, tipo de tampão e solventes orgânicos, selecionaram condições com tampão acetato-fosfato 100 mM pH 4,0 que propiciaram resolução semelhante a IEF convencional [TRAN et al. 1991]. Bristow & Charton visando determinar a distribuição de isoformas de rhEPO e o estabelecimento de alternativa *in vitro*, pesquisaram o método por eletroforese capilar (EC), observaram que a técnica de focalização isoelétrica (IEF) é mais robusta, porém a EC é mais reprodutível e sensível, certamente com vantagens em relação a IEF, que provavelmente atingiu seus limites, sendo sugerida para análise de distribuição de isoformas em produtos farmacêuticos [BRISTOW & CHARTON, 1999]. Cifuentes et al. também desenvolveram método de EC com detecção UV para a separação e quantificação de isoformas de rhEPO [CIFUENTES et al., 1999]. Além disto, foi realizado o acoplamento da EC ao espectrômetro de massas, que possibilitou resolução de um maior número de isoformas com melhor sensibilidade [BOSS et al., 1998; SANZ-NEBOT et al. 2003; NEUSÜß et al., 2005].

Biertlot & Girard desenvolveram método por eletroforese capilar de zona para análise de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo albumina de soro humano, como excipiente. Empregaram tampão fosfato 200mM com 1mM de cloreto de níquel, pH 4,0 e capilar com revestimento interno de amina. O método foi linear na faixa de concentração de 0,03 a 1,92 mg.mL⁻¹, com limite de detecção e quantificação de, respectivamente, 0,01 e 0,03 mg.mL⁻¹. O procedimento foi aplicado para a análise de produtos de dois laboratórios detectando diferenças qualitativas e quantitativas entre as preparações [BIERTLOT & GIRARD, 1997].

Lara-Quintanar et al. desenvolveram método imuno-cromatográfico para a remoção de albumina em produtos farmacêuticos de rhEPO, bem como procedimento preparativo de concentração de amostra para a análise por eletroforese capilar de zona. Empregaram tampão pH 5,5 e capilar de sílica fundida. A metodologia foi sugerida para o controle de qualidade de rhEPO em produtos farmacêuticos [LARA-QUINTANAR et al., 2006].

A rhEPO é uma glicoproteína relativamente estável que permanece em sua forma monomérica, quando armazenada sob refrigeração. Sua integridade é rotineiramente monitorada por cromatografia por exclusão molecular (SEC). Na

substância biológica conservada a 4 °C ou -70 °C, não tem sido detectado agregados, mesmo após 48 meses. Porém, temperaturas mais altas e algumas condições de formulação induzem a rhEPO a inicialmente dimerizar, seguida da formação de agregados de alta massa molecular. Para proteger o produto contra tais agregações é importante conhecer seu mecanismo, razão pela qual tem se efetuado a caracterização dos dímeros de eritropoetina por diferentes técnicas físico-químicas [DEPAOLIS, et al.,1995]. No mesmo sentido, foram produzidos dímeros e trímeros de eritropoetina por ligação química cruzada de formas monoméricas, que são biologicamente ativos, exibindo meia-vida biológica aumentada, sendo mais eficazes *in vivo* do que a forma monomérica convencional. Essas formas diméricas e oligoméricas talvez possam desempenhar papel importante em terapia [DERBY et al., 1996].

Endo et al. avaliaram a formação de agregados de alta massa molecular, em formas glicosiladas e deglicosiladas de rhEPO, após aquecimento, por SEC. O aquecimento a 60 °C em pH neutro resultou em agregados de alta massa molecular de variados tamanhos. Os autores constataram que a concentração de sais aumenta a agregação após o aquecimento, indicando que as cadeias de carboidratos são essenciais para a estabilidade de rhEPO [ENDO et al.,1992].

Gunturi et al. desenvolveram e validaram método por cromatografia de exclusão molecular e detecção por fluorescência para determinar agregados de rhEPO em produtos farmacêuticos contendo 0,03% de polissorbato 80. O método mostrou ser adequado para avaliar a estabilidade e quantificação de agregados presentes em concentração de até 0,2%, em relação ao monômero [GUNTURI et al., 2007].

Luykx et al. desenvolveram método por cromatografia líquida por troca iônica e detecção de fluorescência para a determinação de rhEPO em formulações farmacêuticas, encontrando diferenças 12% superiores, em relação a potência declarada [LUYKX et al., 2005].

Os métodos cromatográficos em fase reversa exploram as propriedades hidrofóbicas das moléculas e em combinação com detecção por ultravioleta, tem sido amplamente utilizados na quantificação de biofármacos, controle de qualidade, separação e quantificação de formas oxidadas e desaminadas das proteínas [RIBELA et al., 2006; AHRER & JUNGBAUER, 2006; DALMORA et al., 2006]. Usando a cromatografia líquida de fase reversa Barth et al. desenvolveram e

validaram método cromatográfico para a avaliação da potência da rhEPO em formulações farmacêuticas em comparação com o ensaio biológico [BARTH et al., 2007].

2.3 Tratamento da anemia na insuficiência renal

A insuficiência renal crônica causa uma grande variedade de distúrbios metabólicos que afeta quase todo o sistema orgânico. Apesar da contínua melhoria do tratamento através da diálise, muitas funções do organismo são prejudicadas. Além disso, muitos medicamentos são frequentemente usados em doenças e complicações urêmicas [LEE et al., 2000].

A saúde das pessoas que sofrem de insuficiência renal está diretamente ligada à possibilidade de purificação do sangue em sessões de hemodiálise. Devido ao fato de pacientes com insuficiência renal possuírem uma capacidade reduzida de excreção de metais tóxicos na urina, alguns órgãos internos podem ser debilitados pelo acúmulo destas espécies no sangue e nos tecidos. Em decorrência disso, diversas drogas são regularmente administradas ao paciente para o tratamento das doenças e complicações urêmicas decorrentes da hemodiálise [LEE et al., 2000].

As drogas mais constantemente utilizadas no tratamento dos pacientes com insuficiência renal são a eritropoetina (rhEPO), a vitamina D₃ (Calcitriol e Alfacalcidol), o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o hidróxido de alumínio, empregadas com o objetivo de manter o nível de hematócritos no sangue e de cálcio nos ossos [LEE et al., 2000].

A anemia é frequentemente observada em pacientes com insuficiência renal e é considerada a consequência mais negativa do tratamento destes pacientes. Juntamente com a hipertensão, é a causa principal de problemas cardiovasculares em pacientes dialisados e transplantados [LOCATELLI et al., 2001; LOCATELLI et al., 2003].

O rim produz um hormônio chamado eritropoetina (EPO), que estimula a produção de glóbulos vermelhos do sangue. O mau funcionamento dos rins ocasiona uma produção insuficiente desta proteína, causando a anemia. O tratamento da anemia é realizado com a reposição de eritropoetina entre outros medicamentos [KOROLKOVAS, 1999; VANHOLDER et al., 2002; HOSOKAWA & YOSHIDA, 1993].

Assim, a aprovação do uso da rhEPO com finalidade terapêutica em humanos deu-se em 1989, inicialmente para o tratamento de anemia associada à doença crônica dos rins. Por fortalecer a produção de eritrócitos, o tratamento com rhEPO melhora o bem-estar do paciente e reduz (ou elimina) a necessidade de transfusão de sangue. Posteriormente, foram aprovadas outras aplicações não-renais para rhEPO, como tratamento da anemia causada pela quimioterapia e prematuridade, redução de transfusão de sangue após uma cirurgia e prevenção de anemia após transplante de medula óssea [WALSH, 1999].

Os primeiros processos clínicos mostraram que as doses intravenosas requeridas, cerca de 200 UI/kg/semana, aumentaram a hemoglobina em 10 -12 g.dl⁻¹ em 90% dos pacientes em hemodiálise, reduzindo a necessidade de transfusão de sangue [WINEARLS, 1998]. A dose mínima eficaz é de 15 a 50 UI.Kg⁻¹ de peso corporal, sendo utilizada três vezes por semana, portanto, a aplicação de 50 a 150 UI.kg⁻¹ normaliza o hematócrito de pacientes anéfricos no período de 3 a 4 meses [VANHOLDER et al., 2002].

Na prática clínica são utilizadas as vias intravenosa, subcutânea e intraperitoneal, a escolha da via depende de condições farmacocinéticas aliada a aspectos de ordem prática. Em paciente tratados com hemodiálise a rhEPO pode ser administrada endovenosamente no final do tratamento, reduzindo o sofrimento do paciente, já em pacientes em terapia conservadora para insuficiência renal, transplantados renais ou em diálise peritoneal é recomendada a utilização subcutânea, de modo a poupar as veias periféricas para futuros acesso vascular, já administração intraperitoneal deve ser reservada para pacientes em diálise peritoneal e em crianças com traumas de injeções [BENTO et al., 2003].

A rhEPO é o único antianêmico renal disponível no Brasil, encontra-se disponível como produto farmacêutico para injeção intravenosa ou subcutânea. O mercado farmacêutico apresenta o medicamento liofilizado (pó branco ou quase branco) ou solução injetável (líquido incolor e transparente) no qual cada frasco-ampola pode conter por mililitro de solução dosagens que variam de 1.000 a 10.000 UI de eritropoetina recombinante humana além de componentes não ativos.

Sendo assim, atualmente, rhEPO é aprovada para uso no tratamento de anemia associada a doenças crônicas (dos rins, câncer e AIDS), em crianças prematuras anêmicas e para reduzir necessidades de transfusão associadas a algumas situações cirúrgicas [BROWNE et al., 1986; LIN et al., 1985 e EGRIE et al.,

1985]. Todos estes usos tornam a rhEPO o biofármaco de maior volume de vendas no mundo.

2.4 Contaminação de medicamentos por metais

O metabolismo anormal de elementos-traço em diálise crônica tem sido estudado nos últimos anos. Entretanto, o conhecimento sobre o assunto ainda é incompleto pela pouca quantidade de amostra, dificuldade em análise e larga discrepância entre valores de medida por diferentes métodos. As fontes de anormalidades de elementos-traço em pacientes de hemodiálise são desconhecidas (exceto para o alumínio). A possibilidade de contaminação por traços metálicos em vários medicamentos e os efeitos desses metais no metabolismo dos pacientes de diálise ainda são desconhecidos [LEE et al., 2000].

Em estudo, realizado por Bohrer et al. investigou-se a contaminação por alumínio dos medicamentos utilizados por pacientes em tratamento de hemodiálise. Produtos comerciais, ingredientes ativos e todas as outras substâncias que compõem estas formulações, incluindo a rhEPO, foram analisadas para o seu teor de alumínio. A presença de alumínio nas formulações comerciais foi atribuída à contaminação da matéria-prima, ao processo de manufatura, aos aditivos e aos recipientes utilizados para estocagem dos medicamentos [BOHRER et al., 2007].

A contaminação por alumínio em produtos farmacêuticos usados parenteralmente vem sendo relacionada à estocagem em recipientes de vidro, devido ao vidro conter alumínio em sua composição, esta contaminação é dependente da natureza da substância, ou seja, da sua afinidade por alumínio [BOHRER et al., 2001; BOHRER et al., 2001; BOHRER et al., 2007]. Bohrer et al. investigaram a contaminação dos medicamentos albumina, heparina, glicose e soluções comerciais de NaCl e de KCl, também foi analisada a contaminação por alumínio em aminoácidos constituintes de soluções de nutrição parenteral. Entre os medicamentos em estudo, a presença de alumínio na albumina foi atribuída ao processo de manufatura e ao tempo de armazenamento, o resultado da análise dos sais, heparina, albumina e glicose demonstraram que o tempo de estocagem é o principal fator responsável pelo aumento da contaminação por alumínio [BOHRER et al., 2001]. Todas as formulações comerciais de aminoácidos apresentaram

contaminação por alumínio, sendo superior a contaminação nas formulações com maiores períodos de estocagem [BOHRER et al., 2001].

Estudo semelhante foi realizado por Bertagnolli, no qual foi determinado a presença de Al, Cd, Cr, Fe, Pb e Zn extraído das embalagens por ação das substâncias usadas em nutrição parenteral em função do tempo de contato, onde observou-se que as soluções interagem com a superfície da embalagem, liberando metais em maior ou menor proporção, dependendo do metal e dos constituintes da solução [BERTAGNILLI, 2008].

Bohrer et al. relacionaram o nível de alumínio no sangue de pacientes em hemodiálise com os medicamentos utilizados, o nível de alumínio encontrado no sangue de pacientes que receberam ferro, insulina e rhEPO, medicamentos mais importantes e amplamente administrados em pacientes em diálise, foi elevado em comparação com os pacientes que não recebem esses produtos, o que demonstra que estas formulações podem ter significativa contribuição para o aumento do alumínio no sangue [BOHRER et al., 2009]. Wilhelm et al. investigaram a presença de alumínio em soro e urina de pacientes com função renal normal em uma unidade de terapia intensiva em relação aos medicamentos utilizados, entre eles sais de cálcio, aditivos para soluções de nutrição parenteral e antibióticos [WILHELM et al., 2001]. O estudo feito por Lee et al. investigou a presença de quantidade anormal de seis metais (Cu, Zn, Al, Pb, Cd e Hg) em sangue de pacientes de hemodiálise e suas relações com drogas frequentemente usadas, entre elas, a rhEPO. Já o estudo realizado por Garmatz investigou a presença de Al, Cr e Ni como contaminantes em formulações de eritropoetina, o método possibilitou a determinação de Al, Cr e Ni livre de interferentes inorgânicos como Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} [GARMATZ, 2007].

Segundo os autores destes trabalhos, a contaminação de pacientes com insuficiência renal pelos metais pode estar associada, entre outras coisas, à presença destes na medicação administrada. Entretanto, não existem outros trabalhos na literatura que relatam a determinação de contaminantes nefrotóxicos nas formulações farmacêuticas de eritropoetina. Por serem as únicas drogas administradas no Brasil para tratamento de anemia associada à insuficiência renal [KOROLKOVAS, 1999] e em doses crescentes, o risco de contaminação através desta medicação é grande e deve ser estudado de forma sistemática.

A possibilidade de contaminação de pacientes de hemodiálise por metais tóxicos presentes nos medicamentos administrados durante o tratamento tem sido

pouco estudada até o presente momento. Entretanto, espécies metálicas podem ser absorvidas pelo organismo do paciente se presentes como contaminantes nos medicamentos utilizados no tratamento dos distúrbios decorrentes da hemodiálise.

2.5 Toxicidade e efeitos dos metais na saúde humana

No organismo dos seres humanos, os elementos traço podem ser divididos em essenciais e não-essenciais. Os primeiros são fundamentais para o desenvolvimento e a manutenção da vida, devido à sua participação em diversos processos bioquímicos. Sua deficiência ou ausência na dieta ocasiona patologias carenciais, por outro lado, o excesso destes elementos pode causar efeitos tóxicos ao organismo. Já os elementos-traço não essenciais são aqueles que não apresentam finalidade definida e possuem efeitos tóxicos sobre o organismo. Dentre os elementos essenciais podemos citar o iodo, o ferro, o zinco, o cobre, o manganês, o molibdênio, o selênio e o cromo [LEUNG, 1995; PLUHATOR-MURTON et al., 1999].

Os elementos não essenciais são aqueles que não participam do metabolismo humano e podem gerar sérios danos à saúde. Os danos variam com o modo, a quantidade e grau de exposição, com o estado nutricional, o metabolismo individual e a capacidade de desintoxicação. Os mecanismos de toxicidade são múltiplos e incluem a inibição de enzimas e/ou co-fatores, a interferência na estrutura na função neuronal ou dos processos de condução nervosa, a interferência na estrutura e função de proteínas e ácidos nucleicos e o aumento da formação de radicais livres [PAVANETTO et al., 1989].

Os efeitos toxicológicos de contaminantes variam de uma espécie para outra, segue abaixo uma breve descrição da toxicidade que o alumínio pode oferecer ao homem.

2.5.1 O Alumínio no organismo humano

O alumínio é considerado um elemento não essencial, porém está presente no organismo humano. A exposição a este elemento se dá oralmente, através de alimentos, medicamentos e água [GREGER & SUTHERLAND, 1997]. O alumínio é um elemento onipresente no ambiente, também, é o metal mais abundante na crosta terrestre, perfazendo cerca 8% de sua massa [LARINI, 1987].

O homem tem contato com o alumínio ou seus compostos diariamente, ingerindo de 10 a 100 mg tanto por via oral como por inalação, através de alimentos, utensílios domésticos, medicamentos e através da água potável, uma vez que sulfato de alumínio é usado como floculante em seu processo de purificação [MERIAN, 1991]. O alumínio proveniente da água potável, mesmo tratada com sulfato de alumínio, baseado num consumo médio diário de 2 litros, é de aproximadamente 0,244 mg, ou seja, correspondente a 1% do total ingerido diariamente [ABAL, 2008]. A concentração máxima permitida de Al em águas potáveis no Brasil, estabelecido pela Portaria nº 518, é de 0,2 mg.L⁻¹[BRASIL, 2004].

Em indivíduos com a função renal normal uma pequena parte do alumínio é absorvida passando a corrente circulatória posteriormente eliminada por via renal. Em indivíduos com função renal enfraquecida ou com insuficiência renal, todo o alumínio absorvido deposita-se no organismo, preferencialmente no tecido ósseo, onde faz trocas com o cálcio, causando osteodistrofia e no tecido cerebral causando encefalopatia [LARINI, 1997; MERIAN, 1991; KLEIN et al., 1991].

Alguns autores relacionam o desenvolvimento de doenças degenerativas como a Doença de Alzheimer [BEQUET et al., 1995] e a Esclerose Lateral Amiotrófica [FAVARATO & MIZZEN, 1992] com a intoxicação por alumínio. A pele, os pulmões e o trato gastrointestinal são barreiras naturais que impedem a entrada de alumínio no corpo humano. O alumínio ingerido é eliminado em sua maior parte *in natura* nas fezes, pois estima-se que o intestino absorva menos que 0,5% de alumínio, e a pequena quantidade de alumínio solúvel que é absorvida é transportada pela corrente sanguínea e excretada na urina. Em indivíduos sadios, pouquíssimo alumínio é retido, mesmo quando ingerido em grandes quantidades [KLEIN, 2005].

O problema surge quando estas barreiras naturais são ultrapassadas, ou seja, quando o alumínio entra na corrente sanguínea através de administração

intravenosa, por medicamentos contaminados com alumínio. Os fatores que influenciam esta contaminação incluem: a contaminação da matéria-prima; o recipiente usado durante o processo de manufatura e estocagem; a contaminação ocorrida pelo processo de manufatura e o tipo de produto. Pois muitas matérias-primas disponíveis para o processamento de medicamentos são contaminadas [BOHRER et al., 2002], bem como os recipientes utilizados na armazenagem e o processo de esterilização dos produtos farmacêuticos contribui para a contaminação dos mesmos [BOHRER et al., 2001; BOHRER et al., 2001; BOHRER et al., 2003].

Quando o alumínio é administrado continuamente, como no caso de soluções de uso parenteral ou na diálise de pacientes urêmicos, mais de 80% do alumínio liga-se a proteínas do soro, albumina e transferrina, somente cerca de 5% é ultrafiltrado, indicando que esta ligação alumínio-proteína não é excretada e entra em equilíbrio com vários tecidos, incluindo ossos, fígado e cérebro [LEUNG, 1985; KLEIN, 2005]. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é recomendado que o alumínio sérico dos pacientes em tratamento hemodialítico regular seja determinado anualmente. A quantificação do alumínio sérico é um indicador útil do grau de contaminação do paciente, quando determinado em intervalos regulares.

O estudo de Frey et al. mostra que o uso de embalagens de polietileno reduz consideravelmente a contaminação por alumínio de alguns medicamentos e, conseqüentemente, reduz a quantidade de alumínio ingerido diariamente por paciente. As soluções que são armazenadas em ampolas ou frascos de vidro são envasadas e levadas à autoclave para esterilização. Este processo enérgico possibilita que a solução dissolva ainda mais alumínio, que está contido no vidro [FREY & MAIER, 2000].

2.5.2 Distribuição do alumínio

O alumínio não é distribuído uniformemente pelo corpo. Metade vai para o plasma sanguíneo, da qual 80% se liga a transferrina (proteína transportadora de ferro), como se o alumínio competisse com o ferro para se ligar a transferrina; os outros 10% se ligam a albumina, 9% se ligam a outras proteínas e 1% constitui o alumínio livre. A outra metade se difunde em fluidos de tecidos extracelulares, similarmente ao que acontece com outros metais. Não há uma distribuição uniforme

dos compostos de alumínio, ou seja, cada órgão incorpora o metal em diferentes graus. O cérebro, por exemplo, incorpora menos alumínio do que o esperado, levando-se em conta a sua massa proporcional e vascularização. Já os ossos incorporam mais alumínio do que pode ser explicado, considerando-se sua massa proporcional e vascularização [MENDONÇA, 2003].

Em pessoas com boas condições de saúde, com funcionamento renal normal, observa-se que o alumínio é assimilado e eliminado dos ossos, competindo com o cálcio para se ligar com as proteínas ósseas, porém este processo é reversível não havendo nenhum dano a função óssea. Da mesma maneira o alumínio também compete com o ferro na formação das hemácias, e similarmente ao que ocorre nos ossos, trata-se de um processo reversível, não ocorrendo anemia ou outro efeito as células sanguíneas [MENDONÇA, 2003]. Entretanto, em pessoas com insuficiência renal crônica, o aumento da concentração de alumínio no sangue e a acumulação no sistema nervoso central são observados [MERIAN, 1991; KLEIN, 2005].

A contaminação de pessoas com insuficiência renal por espécies metálicas pode estar associada à presença destas na medicação empregada, uma vez que estas espécies podem ser absorvidas pelo organismo do paciente. O nível de contaminação através da medicação, nestes casos, dependerá da qualidade da medicação utilizada no tratamento. Já foi demonstrado em trabalho anterior que as formulações de eritropoetina apresentam contaminação por metais [GARMATZ, 2007], sendo assim, este estudo tem por objetivos investigar a contribuição dos excipientes e principalmente da rhEPO na contaminação por alumínio das formulações de eritropoetina, uma vez que o alumínio pode ligar-se a rhEPO assim como se liga a albumina e a transferrina e portanto não ser dialisado. Além disso, verificar a influência do processo de esterilização e do tempo de armazenamento na contaminação por alumínio deste medicamento, uma vez que é armazenado em recipientes de vidro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo da interação do alumínio com as proteínas albumina e eritropoetina, foi realizado por HPLC. A interação individual de cada constituinte das formulações de eritropoetina com o alumínio, proveniente da embalagem utilizada para comercialização do medicamento, foi realizado por ensaio de esterilização e de armazenagem.

3.1 Instrumentação

Para realização deste estudo foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a Líquido Dionex P 680 com sistema de separação isocrático equipado com um detector por ultravioleta/visível (UVD 170U) e software chromeleon versão 6.70.
- Coluna analítica BioSep-SEC 2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm de d.i.;5 μ m).
- Espectrômetro de absorção atômica Analítica Jena Zeenit 600 equipado com forno de grafite com aquecimento transversal, amostrador automático, corretor Zeeman.
- Coletor de frações GradiFrac Pharmacia Biotech.
- pHmetro digital DM 20 Digimed.
- Lavadora ultra-sônica Ultra Cleaner Unique.
- Balança Analítica Sartorius com precisão de 0,1 mg;
- Sistema de purificação de água Milli-Q, resistividade 18,2 M Ω cm⁻¹ Millipore.
- Sistema de ultrafiltração Ultrasart Cell 10 Sartorius.
- Sistema de filtração de eluente Sartorius.

- Câmara de fluxo laminar Trox Technik, modelo FLK, série 683, classe 100.
- Estufa EHRET.
- Vortex CERTOMAT MV B. Braun Biotech Internacional.
- Refrigerador R310 Electrolux.

3.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho estão listados na tabela 1.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada, deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), estas foram armazenadas em recipientes plásticos que, antes do uso, foram submetidos ao processo de descontaminação descrito no item 3.3.

A solução padrão estoque de Al de concentração 10 mg.L^{-1} , foi preparada pela diluição de quantidade apropriada de solução padrão de 1000 mg.L^{-1} para realização das medidas por GF AAS e para o ensaio de incubação com o medicamento.

Os padrões de eritopoetina adquiridos foram mantidos refrigerados em freezer a uma temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, no momento do uso o conteúdo do vial foi diluído a $1000 \mu\text{L}$ com água ultrapura, constituindo assim a solução padrão estoque de $96,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as diluições posteriores foram realizadas em frascos (eppendorfs 1mL) devido ao volume reduzido de solução padrão estoque.

O padrão de albumina humana foi mantido refrigerado em geladeira, no momento do uso a quantidade apropriada foi pesada e diluída em água ultrapura em balão volumétrico, constituindo a solução estoque de 1 g.L^{-1} .

As soluções de proteínas, aminoácidos e outros constituintes do medicamento foram preparadas por pesagem direta, posterior diluição com água ultrapura e ajuste de pH com NaOH 1M e 10M e HCl 10% . As soluções foram esterilizadas conforme descrito no item 3.7 e armazenadas sob refrigeração a temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. As concentrações e pHs das soluções estão listadas na tabela 2.

Tabela 1: Reagentes utilizados

Reagentes	Fabricante
Solução Padrão de Alumínio 1000 mg.g ⁻¹ (1000 mg.g ⁻¹ ± 0,003 mg.g ⁻¹) HCl 5%.	SepSol, rastreado ao SEM 3101 a NIST-USA
Eritropoetina recombinante humana	Calbiochem
Eritropoetina recombinante humana	Aldrich
Eritropoetina recombinante (2° padrão internacional 2003)	NIBSC
Albumina humana	Aldrich
Acetato de Sódio Anidro	Acros Organics
Ácido Acético Glacial P.A	Merck
Ácido Clorídrico P.A 37%	Vetec
Ácido Nítrico P.A 65% bidestilado	Merck
Hidróxido de Sódio P.A	Merck
Treonina	Synth
Glicina	Aldrich
Isoleucina	Sigma
Leucina	Sigma
Fenilalanina	Synth
Ácido glutâmico	Merck
Ácido Cítrico	Merck
Fosfato Dibásico	Merck
Fosfato Monobásico	Merck
Uréia	Vetec
Cloreto de Sódio	Merck
Cloreto de Cálcio	Merck
Citrato de Sódio	Reagen
Manitol	Sigma
Polissorbato	Fluka
EDTA-Ácido etilenodiaminotetracético	Merck

Tabela 2: Soluções de eritropoetina e excipientes dos medicamentos

Solução	Concentração	pH
Eritropoetina recombimante humana	0,184 mg.L ⁻¹	7,23
Albumina humana	50 mg.L ⁻¹	7,23
Treonina	0,05 mol.L ⁻¹	7,32
Glicina	0,05 mol.L ⁻¹	7,39
Isoleucina	0,05 mol.L ⁻¹	7,38
Leucina	0,05 mol.L ⁻¹	7,37
Fenilalanina	0,05 mol.L ⁻¹	7,37
Ácido glutâmico	0,05 mol.L ⁻¹	7,37
Ácido Cítrico	0,05 mol.L ⁻¹	7,35
Fosfato Dibásico	0,05 mol.L ⁻¹	7,36
Fosfato Monobásico	0,05 mol.L ⁻¹	7,32
Uréia	0,05 mol.L ⁻¹	7,32
Cloreto de Sódio	0,05 mol.L ⁻¹	7,31
Cloreto de Cálcio	0,05 mol.L ⁻¹	7,38
Citrato de Sódio	0,05 mol.L ⁻¹	7,37
Manitol	0,05 mol.L ⁻¹	7,33
Polissorbato	0,05 mol.L ⁻¹	7,38
EDTA-Ácido etilenodiaminotetracético	0,05 mol.L ⁻¹	7,35
Água de injeção	-	7,30
Água Ultrapura	-	7,32
Água Ultapura	-	-

3.3 Controle da contaminação

Para garantir uma superfície livre de contaminação por Al, apenas materiais plásticos (polietileno, polipropileno) foram empregados nas análises. Todos os materiais foram deixados pelo menos por 48 horas em solução 10% de HNO₃ em etanol (v/v) e lavados abundantemente com água purificada imediatamente antes do uso [BINOTTO, 2001].

O preparo de amostras, soluções e o ajuste de pH das soluções foram realizados em uma câmara de fluxo laminar, que foi ligada no mínimo 30 minutos antes do início do trabalho, para evitar a contaminação do alumínio do ar.

3.4 Procedimentos analíticos

3.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica Forno de Grafite-GF AAS

3.4.1.1 Condições utilizadas na determinação do alumínio

Para a determinação do alumínio por GF AAS otimizou-se as curvas de pirólise e atomização.

Na tabela 3 encontra-se a descrição dos programas de temperatura, comprimento de onda, fenda e corrente da lâmpada. O gás inerte utilizado nas medidas foi o argônio ultrapuro e a correção de fundo foi realizada por corretor Zeeman.

Tabela 3: Descrição do programa de temperatura para Al determinado por GF AAS

Elemento	Comprimento de onda (λ -nm)	Fenda (nm)	Corrente da lâmpada (mA)		
Alumínio	309.3	0.8	6.0		
Programa de temperatura					
Etapa	T (°C)	Rampa (°C.s ⁻¹)	Aquecimento (s)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L.min ⁻¹)
Secagem	90	5	20	34,0	3,0
Secagem	105	3	20	25,0	3,0
Secagem	110	2	10	12,5	3,0
Pirólise	1500	250	10	15,6	3,0
Auto Zero	1500	0	4	4,0	0,0
Atomização	2650	FP	5	5,0	0,0
Limpeza	2650	500	4	4,1	3,0

3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

3.4.2.1 Sistema Cromatográfico

O sistema de HPLC montado para separar as proteínas, utilizou fase móvel acetato de sódio 40 mM pH 7,30, coluna de exclusão molecular baseada na filtração em gel desenvolvida para separar proteínas e peptídeos, BioSep-SEC- S2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm de d.i.; 5 μ m) e duas alças de amostragem (20 μ L e 100 μ L), a alça de 100 μ L foi mais utilizada pois demonstrou ser a mais indicada neste estudo, uma vez que se fez necessário um volume maior de injeção devido a coleta de frações para posterior medida por GF AAS, a alça de 20 μ L foi utilizada somente para a validação e quantificação de rhEPO, devido ao reduzido volume de solução padrão de rhEPO e o alto custo para a aquisição do mesmo.

A detecção dos analitos foi feita por fotometria no ultravioleta no comprimento de onda de 215 nm. A figura 4 ilustra o sistema de HPLC para este estudo, sendo o coletor de frações utilizado somente quando o objetivo foi o de estudar a interação alumínio-proteína.

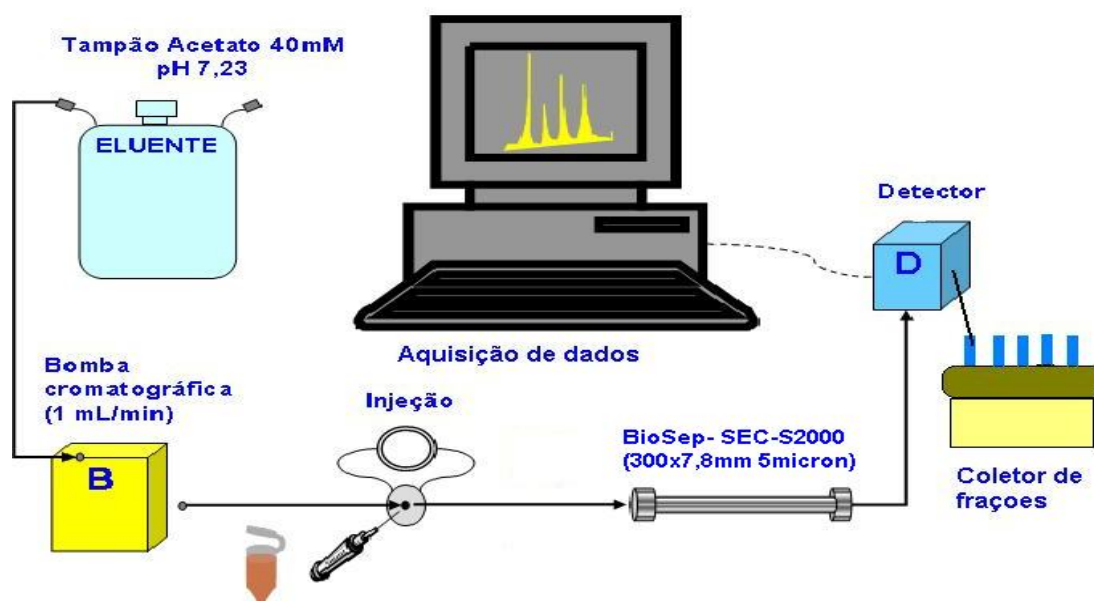


Figura 4: Sistema de HPLC usado para separação e quantificação de albumina e eritropoetina e também para a coleta de frações para medidas por GF AAS

3.4.2.2 Validação do Método Cromatográfico

Os parâmetros analíticos avaliados foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Estes foram avaliados visando à validação do método de análise das formulações farmacêuticas de eritropoetina por HPLC.

Para o procedimento da validação as condições analíticas adotadas estão mostradas na tabela 4.

Tabela 4: Condições cromatográficas otimizadas para a validação

Fase móvel	Acetato de sódio 40 mM pH 7,30
Modo de eluição	Isocrático
Fase estacionária	Sílica gel
Comprimento de onda	215 nm
Volume de injeção eritropoetina	20 µL
Volume de injeção albumina	100 µL

3.4.2.2.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração desenvolvidas em dias diferentes e contendo cinco níveis de concentração cada uma delas, avaliando-se a correlação linear.

3.4.2.2.2 Limite de detecção

Os valores limite de detecção foram calculados a partir da fórmula descrita no ICH (Conferência internacional sobre harmonização) de 1996, que utiliza o desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão:

$$LD = 3,3\sigma / IC$$

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

3.4.2.2.3 Limite de quantificação

No método que foi validado neste trabalho, os valores limite de quantificação foram calculados a partir da fórmula descrita no ICH de 1996, que utiliza o desvio padrão do intercepto e inclinação da curva padrão:

$$LQ = 10\sigma / IC$$

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

3.4.2.2.4 Precisão intra-dia ou repetitividade

Foram realizadas seis determinações de eritropoetina e albumina na amostra de Eritromax 10.000 UI diluído 1/10 no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais.

3.4.2.2.5 Precisão inter-dia ou precisão intermediária

A precisão inter-dia foi avaliada pela realização de análises da amostra Eritromax 10.000 UI diluído 1/10 em três dias diferentes.

3.4.2.2.6 Exatidão

Foi determinada através do percentual de recuperação de SQR (substância química de referência) adicionada a amostra, sendo que os resultados foram expressos como percentual de recuperação.

Os ensaios foram feitos separadamente, as amostras utilizadas foram: Alfaepoetina 4.000 UI, Eritropoetina 4.000 UI e Eritromax 3.000 UI, todos apresentando a diluição final de 1/10.

Para o ensaio de recuperação da albumina adicionou-se $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do padrão de albumina em cada amostra e estas foram injetadas em triplicata e para a eritropoetina, devido ao reduzido volume de padrão disponível, adicionou-se 2,6

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ do padrão de eritropoetina somente na amostra Eritromax 3.000 UI e esta foi injetada em triplicata.

3.4.2.2.7 Robustez

A robutez do método foi verificada através de pequenas variações na constituição e pH da fase móvel sobre a determinação das amostras. E também por variações mais bruscas, como mudança na constituição da fase móvel e no comprimento de onda de detecção.

3.5 Quantificação de eritropoetina e albumina

A quantificação das proteínas foi realizada por HPLC, sistema descrito no item 3.4.2.1.

3.6 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas presentes no medicamento por meio de coletas de frações

O estudo da interação proteína-alumínio foi realizado por incubação das amostras com o padrão de alumínio, posterior injeção no sistema cromatográfico mostrado na figura 4 item 3.4.2.1 onde foram coletadas frações de 1 mL eluídas da coluna cromatográfica, o alumínio presente em cada fração foi determinado por GF AAS.

Para estimar a interação alumínio-eritropoetina e alumínio-albumina nas amostras utilizaram-se os medicamentos: Eritropoetina 4.000 UI.mL^{-1} Bio-Manguinhos, Alfaepoetina 4.000 UI.mL^{-1} Blaüsiegel e Recormon $10.000 \text{ UI.mL}^{-1}$ Roche.

Primeiramente realizou-se a determinação de alumínio nas amostras por GF AAS, após foi realizado um ensaio para estimar a interação de alumínio com a fase estacionária da coluna cromatográfica, neste ensaio foi injetado no sistema cromatográfico somente o padrão de alumínio sem a presença da amostra, frações de 1 mL foram coletas por um período de 120 minutos e o alumínio presente em cada fração foi determinado por GF AAS, em seguida foi iniciado o estudo da interação de alumínio com as amostras.

Em câmara de fluxo laminar os medicamentos *Alfaepoetina*[®], *Eritropoetina*[®] e *Recormon*[®] foram diluídos cinco vezes em água ultrapura, destas soluções transferiu-se 500 µL para frascos (epperdorfs 1mL) e adicionou-se 500 µL do padrão de alumínio 10 mg.L⁻¹, resultando em uma adição de 5 mg.L⁻¹ de Al e na diluição final dos medicamentos de 1/10. Para o medicamento *Alfaepoetina*[®], também foi realizada a diluição 1/1 do medicamento com o padrão de Al, para isso, adicionou-se 500 µL do padrão de alumínio 10 mg.L⁻¹ em 500 µL do medicamento.

O tempo de incubação foi de 4 horas e 16 horas em temperaturas de 4 °C, 23 °C e 37 °C, para simular respectivamente a temperatura de armazenamento, a ambiente e a temperatura fisiológica. Após o período de incubação estipulado, as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico. Foi utilizada uma alça de amostragem de 100 µL e alíquotas de 1 mL foram coletadas no decorrer da corrida cromatográfica, sendo estas medidas posteriormente feitas por GF AAS.

3.7 Avaliação da interação de alumínio com eritropoetina e excipientes do medicamento (ensaio de esterilização e armazenagem)

Para a realização do ensaio de armazenagem das proteínas, aminoácidos e outros excipientes das formulações de eritropoetina utilizaram-se frascos de vidro (tipo1) e frascos cônicos de plástico, ambos de 50 mL. Os frascos cônicos de plástico passaram pelo processo de descontaminação, descrito no item 3.3, já os frascos de vidro como não apresentavam uso anterior somente foram lavados com água ultrapura e secos em câmara de fluxo laminar.

Antes do envase das soluções fez-se a determinação por GF AAS de alumínio existente nas soluções (tabela 2 item 3.2). Na câmara de fluxo laminar foi realizado envase das soluções nos frascos de vidro e também a imersão das tampas no mesmo volume de solução (50 mL) nos frascos cônicos de plástico, para estimar quanto de alumínio extraído é proveniente da tampa de borracha usada para vedar os frascos.

Os frascos foram levados à estufa que foi mantida a 121 °C por 4 horas para simular o processo de esterilização. Após retirou-se uma alíquota das soluções envasadas e esterilizadas e determinou-se o alumínio por GF AAS.

Os frascos foram mantidos refrigerados a temperatura de 5 °C e alíquotas foram coletadas por um período de 90 dias.

A interação do alumínio com os componentes do medicamento na etapa de esterilização, foi estimada pela diferença de teor de alumínio determinado na solução pré-esterilização e solução pós-esterilização. No ensaio de armazenagem a interação do alumínio proveniente do vidro e da tampa de borracha com as soluções foi estimado pela determinação de Al extraído ao longo do tempo.

3.8 Ultrafiltração

Foram utilizadas membranas poliméricas comerciais de ultrafiltração de poli (éter-sulfona) PES (Sartorius) com corte molecular de 10 e 50 kDa, as membranas foram descontaminadas em HCl 10%, lavadas em abundância com água ultrapura e antes da ultrafiltração da amostra realizou-se uma ultrafiltração branco utilizando água ultrapura .

Foram preparadas soluções através da diluição 1/1 do padrão de eritropoetina ($48,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e dos medicamentos com a solução padrão de Al de 1 mg.L^{-1} resultando na adição de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al em cada solução, que foram incubadas por 48 horas na temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

As soluções foram analisadas por GF AAS, onde foi quantificado o alumínio presente nas soluções antes da adição de Al e também após a adição, mas sem a etapa de ultrafiltração, posteriormente as amostras foram ultrafiltradas e o alumínio foi medido na fração ultrafiltrada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do método cromatográfico

A validação de um procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida [ICH, 1996]. Um método para um composto majoritário como a eritropoetina e a albumina em formulações farmacêuticas das mesmas, requer critérios de aceitação e abordagens diferentes de métodos desenvolvidos para análise de traços em fluidos biológicos ou de métodos de doseamento da quantidade proteína ativa no medicamento. A frequência que o método será utilizado, também influencia no processo de validação, uma vez que o método pode ser usado somente para um estudo breve ou como um procedimento de análise permanente do laboratório. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na finalidade de uso do método, desta forma, os experimentos podem ser limitados ao que realmente é necessário [RIBANI et al., 2004].

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar método por HPLC para determinação de eritropoetina recombinante humana (rhEPO) e albumina humana em medicamentos de eritropoetina, uma vez que esta técnica não é relatada para a determinação dessas substâncias nas formas farmacêuticas disponíveis. A eritropoetina tem sido determinada em medicamentos para dosar sua atividade biológica visando o controle de qualidade dos mesmos e em fluidos biológicos devido a ser utilizada como *doping*.

4.1.2. Processo de validação

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação [RIBANI et al., 2004].

A validação de um método analítico assegura a credibilidade deste durante a rotina laboratorial [ICH, 1994]. É um processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para avaliação analítica pretendida [USP 28, 2005]. A validação não

infeere que o método é livre de erros, somente confirma que ele é adequado para a proposta [MEHTA, 1997]. Segundo a Resolução nº899 de maio de 2003 [ANVISA, 2003], a qual dispõe uma guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A resolução também ressalta que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

Os parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação dos métodos de análise incluem a linearidade, a exatidão, a precisão, a especificidade, a robustez e os limites de detecção e quantificação [ICH, 1996; USP 28, 2005]. Apesar dos esforços realizados para a harmonização das definições em torno da validação, a literatura disponível tem demonstrado haver diferenças, o que acaba ocasionando discordâncias entre os profissionais de controle de qualidade no que diz respeito à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação. É de responsabilidade do analista identificar quais deles devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método analítico [ERMER, 2001]. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais devem ser os parâmetros a serem investigados [RIBANI et al., 2004].

O desenvolvimento do trabalho foi realizado de acordo com protocolos e resoluções das agências reguladoras brasileiras e internacionais, como a Agência de Vigilância Sanitária, Resolução nº899 de maio de 2003 [ANVISA, 2003] e o Protocolo Harmonizado Internacional [ICH, 1994 e ICH, 1996].

4.1.2.1 Linearidade

Corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada faixa de aplicação [ANVISA, 2003]. Recomenda-se que sua determinação seja realizada através de um mínimo de cinco concentrações, e que seja repetida em diferentes dias. Os resultados devem ser analisados por métodos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

No método validado neste trabalho foram utilizados cinco pontos para definir a reta da albumina e da eritropoetina em suas curvas de calibração. A faixa de

concentração linear da eritropoetina foi de 0,0170 - 13,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e da albumina 0,1407 - 403,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A tabela 5 e 6 apresenta as áreas absolutas correspondentes à albumina e eritropoetina referentes a cada uma das diluições da substância química de referência.

Tabela 5: Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão de albumina através de HPLC

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Áreas absolutas *			RSD (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
36,00	21,84	22,74	22,42	2,00
72,00	44,05	45,05	44,80	1,20
144,00	93,15	93,32	92,63	0,50
216,00	141,15	143,78	143,46	1,00
403,20	260,94	266,08	233,53	1,20

* Cada valor é a média de três áreas
RSD = Desvio padrão relativo

Tabela 6: Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão de eritropoetina através de HPLC

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Áreas absolutas *			RSD (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
0,26	0,25	0,28	0,26	6,70
0,65	0,42	0,49	0,49	10,00
2,60	2,66	2,56	3,16	11,70
6,50	4,39	4,43	4,47	0,90
13,00	8,79	10,02	10,12	7,70

* Cada valor é a média de três áreas
RSD = Desvio padrão relativo

A representação das curvas padrão e equações da reta, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na figura 5 e

figura 6, ambas possuem o coeficiente de correlação linear próximo de 1,0 caracterizando a linearidade deste método.

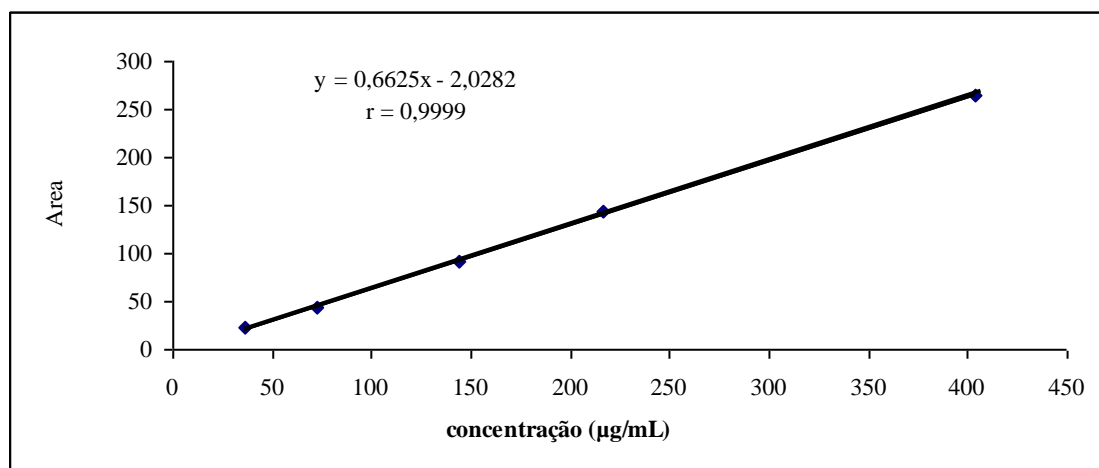


Figura 5: Representação gráfica da curva padrão de albumina obtida através de HPLC (n=3)

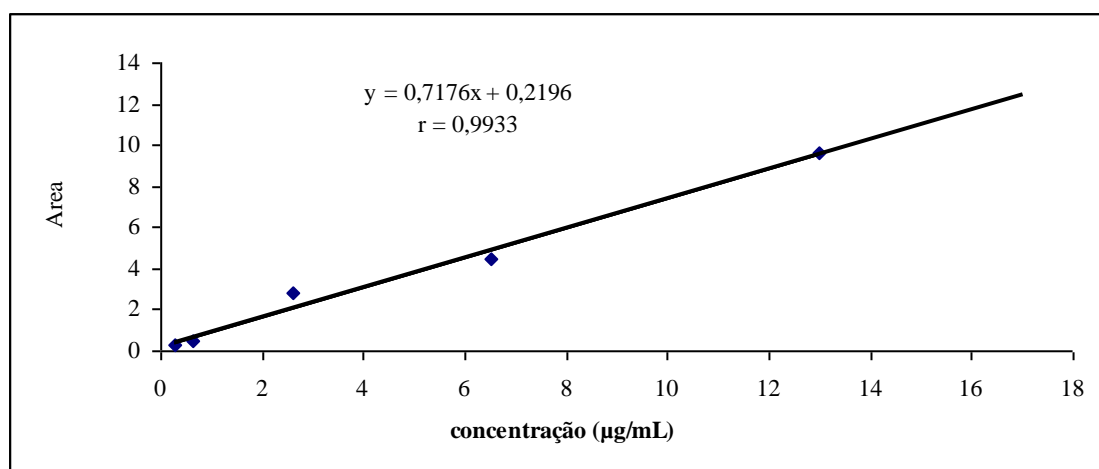


Figura 6: Representação gráfica da curva padrão de eritropoetina obtida através de HPLC (n=3)

4.1.2.2 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada e o LQ a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada, ambos com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

No método que foi validado neste trabalho, os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da fórmula descrita no ICH de 1996. Os LDs e LQs da albumina e eritropoetina estão listadas na tabela 7.

Tabela 7: Limites de detecção e quantificação da albumina e eritropoetina

	Branco (água ultrapura) (n=10)	
	Albumina	Eritropoetina
Área	0,0033	0,0092
	0,0046	0,0080
	0,0040	0,0079
	0,0053	0,0078
	0,0022	0,0066
	0,0010	0,0107
	0,0032	0,0930
	0,0047	0,0089
	0,0042	0,0081
	0,0051	0,0069
σ	0,0093	0,0012
Equação da reta	$y = 0,6625x - 2,0282$	$y = 0,7176x + 0,2196$
IC	0,6625	0,7176
r	0,9999	0,9933
LD	0,0464 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0056 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
LQ	0,1407 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,0170 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

σ = desvio padrão do intercepto da curva padrão

IC = inclinação da curva padrão

r = coeficiente de correlação linear

A partir da determinação destes valores observamos que o método é sensível para concentrações baixas de eritropoetina e albumina.

4.1.2.3 Precisão

Representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste.

A precisão pode ser medida através da repetitividade (precisão intra-dia), da precisão intermediária (precisão inter-dia) e da reprodutibilidade. A repetitividade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como dias, analistas ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em laboratórios diferentes, como parte de um estudo comparativo.

A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (RSD), e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o Teste *F*.

Para o método validado neste trabalho a precisão foi determinada a partir de seis determinações em um mesmo dia e sob as mesmas condições da amostra Eritromax 10.000 UI diluída 1/10 (repetitividade ou precisão intra-dia). A precisão intermediária (inter-dia) foi realizada a partir das análises em três dias diferentes, sob as mesmas condições da amostra Eritromax 10.000 UI diluída 1/10. Os resultados obtidos para a precisão intra-dia encontram-se na tabela 8 e da precisão inter-dia na tabela 9.

Tabela 8: Resultados obtidos para a precisão intra-dia na análise de albumina e eritropoetina nas formulações farmacêuticas

Amostra	<i>Eritromax</i> [®]	
	Albumina (g.mL ⁻¹)	Eritropoetina (µg.mL ⁻¹)
1	3,45	107,8
2	3,45	108,8
3	3,45	104,8
4	3,44	109,1
5	3,45	108,2
6	3,45	105,9
Média	3,45	108,1
e.p.m	0,00	1,7
RSD (%)	0,12	1,6

e.p.m = Erro padrão da média

RSD = Desvio padrão relativo

Tabela 9: Resultados obtidos para a precisão inter-dia na análise de albumina e eritropoetina nas formulações farmacêuticas em dias diferentes

Amostra	<i>Eritromax</i> [®]	
	Albumina (g.mL ⁻¹)	Eritropoetina (µg.mL ⁻¹)
1	^a 3,45	^a 107,8
2	^b 3,44	^b 105,4
3	^b 3,45	^b 109,7
Média	3,45	107,4
e.p.m	0,00	2,1
RSD (%)	0,07	2,0

^a média de seis determinações

^b média de três determinações

e.p.m = Erro padrão da média

RSD = Desvio padrão relativo

A precisão inter-dia apresentou um RSD de 0,12% para albumina e de 1,59% para a eritropoetina, mostrando que o método é preciso para a análise de eritropoetina e albumina, pois considera-se a precisão metodológica satisfatória a obtenção de RSD \pm 15% em validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas [CAUSON, 1997].

Análises de variância (ANOVA) indicaram que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em diferentes dias. Os valores de F calculados foram 1,04 e 2,89, respectivamente para a albumina e eritropoetina (valor tabelado: 4,256), não indicando nenhuma diferença significativa entre os resultados obtidos em dia diferentes ($P < 0,05$).

4.1.2.4 Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método com os valores aceitos como referência. A exatidão pode ser expressa como percentual de resposta obtido através de ensaio de uma quantidade da substância de pureza conhecida SQR (substância química de referência) incorporada em um meio de composição definida. Pode ser determinada através do teste de recuperação, em que quantidades conhecidas da substância química de referência são adicionadas a amostra, e então recuperadas.

A exatidão foi determinada para o método validado neste trabalho através do teste de recuperação, sendo expressa como percentual de recuperação e foi avaliada a partir do teste t de Student.

A percentagem de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C_A = concentração de proteína encontrada na amostra adicionada de SQR.

C_{NA} = concentração de proteína encontrada na amostra não adicionada de SQR.

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra.

Para o teste de recuperação prepararam-se soluções das amostras: Alfaepoetina 4.000 UI, Eritropoetina 4.000 UI e Eritromax 3.000 UI, todos

apresentando a diluição final de 1/10. Adicionou-se $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do padrão de albumina em cada amostra e estas foram injetadas em triplicatas e para a eritropoetina adicionou-se $2,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do padrão de eritropoetina somente na amostra Eritromax 3.000 UI, devido ao reduzido volume de padrão disponível, e esta foi injetada em triplicata.

Tabela 10: Resultados obtidos no teste de recuperação de albumina em formulações farmacêuticas

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade de SQR</i>		%Recuperação
	Adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
<i>Alfaepoetina</i> [®]	60,0	74,4	124
	60,0	61,7	101
	60,0	68,0	113
<i>Eritromax</i> [®]	60,0	44,5	74
	60,0	71,1	118
	60,0	56,9	93
<i>Eritropoetina</i> [®]	60,0	61,9	110
	60,0	50,3	84
	60,0	69,2	115

Tabela 11: Resultados obtidos no teste de recuperação de eritropoetina em formulações farmacêuticas

<i>Amostra</i>	<i>Quantidade de SQR</i>		%Recuperação
	Adicionada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
<i>Eritromax</i> [®]	2,6	3,2	123
	2,6	2,8	107
	2,6	2,5	97

O teste de t de Student foi aplicado para avaliar a exatidão, os resultados de albumina foram 2,75 para *Alfaepoetina*[®]; 0,52 para *Eritromax*[®]; 1,49 para *Eritropoetina*[®] e de rhEPO foi de 1,72 para *Eritromax*[®], sendo o valor tabelado de 2,78 (P < 0,05), portanto, os resultados não mostram diferença significativa entre as quantidades adicionadas e as quantidades encontradas.

Os valores das recuperações estão nas tabelas 10 e 11, sendo que a média de albumina foi 113% para *Alfaepoetina*[®]; 95% para *Eritromax*[®]; 103% para *Eritropoetina*[®] e 109% de rhEPO para *Eritromax*[®], demonstrando que o método pode ser utilizado para quantificá-las.

4.1.2.5 Robustez

Durante a validação do método ocorreram variações nas condições analíticas, foram utilizados reagentes de marcas diferentes, a constituição da fase móvel apresentou pequenas variações tanto de concentração de 37,23 mM a 43,17 mM, como no pH de 7,28 a 7,32, não resultando em diferenças significativas no resultado da análise. No entanto o método desenvolvido foi submetido a algumas modificações mais bruscas na composição da fase móvel e também no comprimento de onda selecionado a fim de verificar a sua capacidade de sustentabilidade a variações na determinação das proteínas em estudo.

Os valores obtidos na determinação de eritropoetina e albumina nas formulações farmacêuticas através das alterações nas condições cromatográficas otimizadas, estão demonstrados nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Avaliação da robustez do método de HPLC através da determinação de eritropoetina e albumina em formulações farmacêuticas alterando o comprimento de onda de detecção

Amostra	<i>Eritromax</i> [®]	
	Albumina (g.mL ⁻¹)	Eritropoetina (µg.mL ⁻¹)
λ = 220 nm	3,26 ± 0,06	103,4 ± 0,9
λ = 215 nm*	3,45 ± 0,20	108,1 ± 1,6

* usado

Tabela 13: Avaliação da robustez do método de HPLC através da determinação de eritropoetina e albumina em formulações farmacêuticas alterando a concentração da fase móvel

Amostra	Eritromax [®]	
	Albumina (g.mL ⁻¹)	Eritropoetina (µg.mL ⁻¹)
80mM	2,71 ± 0,01	182,7 ± 0,4
40mM*	3,45 ± 0,20	108,1 ± 1,6

* usado

Alterando as condições tanto de composição da fase móvel como do comprimento de onda não houve variação nos tempos de retenção. Alterando o comprimento de onda ocorreu uma pequena diminuição nas concentrações de ambas as proteínas quando comparadas ao valor no comprimento de onda escolhido (215nm) em decorrência da menor absorção das proteínas neste comprimento de onda.

Aumentando a força de eluição observou-se um aumento da concentração da eritropoetina e diminuição da albumina em relação à composição escolhida (40mM), porém o pico da eritropoetina ficou muito próximo a um pico no tempo de retenção de 9,11 minutos existente no cromatograma das amostras, cujo composto não foi identificado.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que o método proposto apresenta robustez adequada, pois permitiu a quantificação de ambas as proteínas quando pequenas variações foram impostas e também por não apresentar grande modificação de concentração quando em variações maiores dos parâmetros estabelecidos.

4.1.2.6 Aplicação do método: Quantificação de eritropoetina recombinante humana e albumina humana

Os valores experimentais obtidos na quantificação de eritropoetina e albumina nas formulações farmacêuticas encontram-se na tabela 14. Observa-se que as

medidas não possuem o intervalo de confiança, fato que se deve ao reduzido volume das amostras disponível para os ensaios.

Tabela 14: Resultados obtidos para a determinação de rhEPO e albumina humana em amostras comerciais através de HPLC

Medicamento	Fabricante	Data de validade	Albumina (g.L ⁻¹)	rhEPO (mg.L ⁻¹)
Alfaepoetina 4.000UI	Blaüsiegel	09/2008	3,64	55,7
Eritropoetina 4.000UI	Bio- Manguinhos	11/2006	3,36	55,6
Eritromax 2.000UI	Blaüsiegel	06/2006	2,44	46,8
Eritromax 3.000UI	Blaüsiegel	01/2008	3,11	56,2
Eritromax 4.000UI	Blaüsiegel	03/2005	3,40	50,6
Eritromax 10.000UI	Blaüsiegel	09/2006	3,47	110,2
Hemax 3.000U	Eritron	07/2007	3,11	69,9
Recormon 10.000UI	Roche	05/2009	—	194,5

4.2 Estudo da interação entre alumínio e os constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana

Este trabalho teve por objetivos, verificar se há interação entre os componentes das formulações de rhEPO e o alumínio proveniente da embalagem e também verificar a contribuição do processo de esterilização e do tempo de armazenamento destas soluções com relação à contaminação por alumínio.

O mercado farmacêutico apresenta o medicamento liofilizado (pó branco ou quase branco) ou solução injetável (líquido incolor e transparente) no qual cada frasco-ampola pode conter por mililitros de solução dosagens que variam de 1000 a 10.000 UI de eritropoetina recombinante além de componentes não ativos. Seja na forma de pó-liofilizado ou solução injetável a rhEPO é armazenada em recipientes de vidro com tampa de borracha. Na tabela 15 pode ser observada a composição das formulações de rhEPO, sua forma farmacêutica e de apresentação.

Tabela 15: Formas farmacêuticas, apresentações e composições da eritropoetina humana recombinante (rhEPO)

Nome comercial	Forma farmacêutica	Apresentação	Composição (componentes não-ativos)
<i>Eritromax</i> [®] Blaüsiegel	Pó liofilizado	Frasco-ampola com 1.000 UI, 2.000 UI, 3.000 UI, 4.000 UI ou 10.000 UI de eritropoetina humana recombinante, acompanhado de ampola de 1 mL de diluente.	Glicina, albumina humana, fosfato monossódico monohidratado, fosfato dissódico.
	Solução injetável	Frasco-ampola com 2.000, 4.000 e 10.000 UI/mL ou 1.000, 2.000 e 4.000 UI/2mL de eritropoetina humana recombinante.	Cloreto de sódio, fosfato monossódico, fosfato dissódico, albumina humana e água para injetáveis.
	Solução injetável	Seringa preenchida com 1.000UI/0,5 mL, 2.000UI/1mL, 3.000UI/0,3mL, 4.000UI/ 0,4mL,	Cloreto de sódio, fosfato monossódico, fosfato dissódico, albumina humana

		4.000UI/0,5mL, 4.000UI/1mL, 10.000UI/1mL de eritropoetina humana recombinante.	e água para injetáveis.
<i>Eritropoetina</i> [®] Bio- Manguinhos	Solução injetável	Cada ampola de 1 ml contém 2.000 UI ou 4.000UI de eritropoetina alfa humana recombinante em água de injeção.	Albumina humana, citrato de sódio, cloreto de sódio; ácido cítrico e polissorbato 20 e água para injetáveis.
<i>Recormon</i> [®] Roche	Solução injetável	Seringa preenchida com 10.000UI, 30.000 UI de betapoetina em 0,6 mL de água para injeção.	Uréia, cloreto de sódio, polissorbato 20, fosfato monossódico, fosfato dissódico, cloreto de cálcio, glicina, leucina, isoleucina, treonina, ácido glutâmico, fenilalanina e água para injetáveis.
<i>Hemax- Eritron</i> [®]	Pó liofilizado	Frasco-ampola com 1.000 UI, 2.000 UI, 3000 UI, 4.000 UI e 10.000 UI de EPO acompanhado de ampola de 1 mL ou de 2 mL de diluente	Albumina humana, manitol, cloreto de sódio, fosfato monossódico, fosfato dissódico Dodecahidratado
<i>Alfaepoetina</i> [®] Blaüsiegel	Pó liofilizado	Frasco-ampola contendo 1.000 UI, 2.000 UI, 3.000 UI ou 4.000 UI de	Glicina, albumina humana, fosfato monossódico

	Alfaepoetina acompanhado de ampola de diluente (1mL de água destilada para injetável).	monohidratado , fosfato dissódico.
Solução injetável	Frasco-ampola de Alfaepoetina nas dosagens 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 ou 10.000 UI/mL	Albumina humana, cloreto de sódio, citrato de sódio, ácido cítrico e água para injetáveis.
Solução injetável	Seringa preenchida com 1.000UI/0,5 mL, 2.000UI/1mL, 3.000UI/0,3mL, 4.000UI/ 0,4mL, 4.000UI/1mL, 10.000UI/1mL 40.000UI/1mL de Alfaepoetina.	Albumina humana, cloreto de sódio, citrato de sódio, ácido cítrico e água para injetáveis.

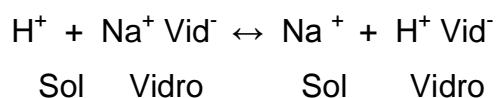
A composição percentual (m/m) de Al_2O_3 em embalagens de vidro tipo1 (borossilicato) para frascos de pequeno volume é de 7,0% [BERTAGNOLLI, 2008], e a borracha cinza de halobutil possui em sua composição 3,9% de alumínio [BINOTTO, 2001]. Já foi demonstrado em trabalhos anteriores, que a principal fonte de contaminação em medicamentos são as embalagens, ou seja, o contato com a superfície do vidro pode promover a migração dos metais da embalagem para o medicamento [BINOTTO, 2001; BERTAGNOLLI, 2008]. Além disto, a taxa na qual o alumínio é extraído do vidro depende da composição da solução. A presença de agentes complexantes com afinidade pelo alumínio como o citrato é capaz de promover a migração de elevada quantidade de alumínio comparada com a água ultrapura ou ainda soluções de sais como NaCl ou KCl [MARTINS, 2000].

O alumínio se liga na estrutura do silicato de diferentes maneiras, dependendo da quantidade adicionada e dos outros componentes do vidro, ele pode estar formando tetraedros $[AlO_4]$ com número de coordenação 4, semelhantes ao

silício, ou com número de coordenação 6, formando octaedros $[AlO_6]$. Ou seja, o Al_2O_3 adicionado à massa do vidro pode agir como formador de rede, podendo ter seus íons Al^{3+} fortemente ligados a rede SiO_4 ou modificador de rede, onde atua no equilíbrio de cargas [LANGE, 1993].

Apesar dos vidros usados para armazenar medicamentos possuírem resistência hidrolítica elevada, eles podem se dissolver se expostos a soluções alcalinas, havendo diluição da superfície do vidro pelo ataque às ligações químicas, quando em contato com soluções ácidas é favorecida a troca de íons metálicos do meio para o vidro e vice-versa.

A superfície do vidro é quimicamente reativa devido aos grupos Si-OH, que são trocadores iônicos efetivos. Os eletrodos de vidro sensíveis aos íons H^+ funcionam sob esta característica, onde átomos de oxigênio carregados negativamente podem se ligar a cátions de tamanho conveniente, por exemplo, sódio, e que podem ser trocados pelos prótons da solução, como na reação [SKOOG, 1997]:



As borrachas (elastômeros) utilizadas como material na fabricação de componentes das embalagens de medicamentos possuem propriedades desejáveis, como compressibilidade e elasticidade. Alguns elastômeros são formulados especificamente para selar pequenas fissuras, tais como gargalos de frasco-ampola ou superfície interna de seringas hipodérmicas. A formulação da borracha é um complexo de 2 a 10 ou mais componentes, estes são classificados de acordo com sua função na formulação. Os componentes usados na borracha utilizada em produtos farmacêuticos são: elastômero, agente vulcanizante, aceleradores, ativadores, antioxidantes, plastificante/lubrificante, cargas e pigmentos [AVIS, et al., 1986]. Tanto o frasco-ampola como a seringa que servem de embalagem para as formulações de eritropoetina apresentam tampa de borracha cinza, estas podem ser de halobutil ou de silicone.

Na primeira parte deste trabalho investigou-se o grau de contaminação das formulações de eritropoetina por alumínio. Na tabela 16 estão os resultados obtidos na determinação de alumínio em amostras comerciais armazenadas em frasco-ampola e seringa, os medicamentos apresentam prazo de validade de 48 meses a partir de sua fabricação.

Tabela 16: Teor de Al presentes em amostras comerciais armazenadas em vidro, determinado por GF AAS

Medicamento	Fabricante	Data de validade	Al ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Alfaepoetina 4.000 UI (ampola)	Blaüsiegel	11/2006	1023,0 \pm 1,9
Alfaepoetina 4.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	09/2007	979,7 \pm 3,6
Alfaepoetina 4.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	09/2008	783,2 \pm 4,2
Eritromax 4.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	03/2005	461,4 \pm 4,0
Eritromax 10.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	09/2006	243,0 \pm 4,3
Eritromax 3.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	06/2007	98,2 \pm 7,9
Eritromax 3.000 UI (frasco-ampola)	Blaüsiegel	01/2008	83,4 \pm 9,2
Hemax 3.000 UI (liofilizado) (frasco-ampola)	Eritron	07/2007	13,2 \pm 2,2
Recormon 10.000 UI (seringa)	Roche	05/2009	63,3 \pm 15,1

Os resultados da tabela 16 mostram que o medicamento *Hemax*[®] é o medicamento menos contaminado por alumínio, fato que se deve a sua forma de apresentação em pó-liofilizado, enquanto a forma de apresentação dos outros medicamentos analisados foi de solução injetável. Também podemos observar que em medicamentos análogos há maior teor de alumínio em tempo de prateleira maior, como o caso da *Alfaepoetina*[®].

Observando a *Alfaepoetina*[®] e o *Eritromax*[®], ambos do mesmo fabricante, constata-se que o *Eritromax*[®] apesar de apresentar tempo de prateleira maior apresenta menor teor de contaminação por alumínio, fato que se deve aos excipientes dos medicamentos, os quais são citados na tabela 15, pois como mostrado a seguir no item 4.2.2.2, o citrato de sódio e o ácido cítrico presentes na *Alfaepoetina*[®] possuem maior interação com o alumínio presente no vidro, retirando praticamente o dobro de alumínio em comparação com o fosfato de sódio dibásico e monobásico presentes no *Eritromax*[®]. Pela tabela 15 constata-se ainda que não há relação entre Al extraído do vidro e quantidade de proteína ativa em termos de

unidades internacionais (UI), pois pode-se ter maior massa de proteína e pouca atividade biológica da mesma no medicamento.

Devido ao *Hemax*[®] (liofilizado) apresentar baixo teor de alumínio em comparação aos outros medicamentos (solução injetável) analisados, realizou-se um ensaio em que o produto foi reconstituído e a solução obtida de *Hemax*[®] foi mantida refrigerada simulando o armazenamento dos medicamentos na forma de solução. Foram realizadas determinações de alumínio no período de 35 dias, o resultado deste ensaio encontra-se na figura 7.

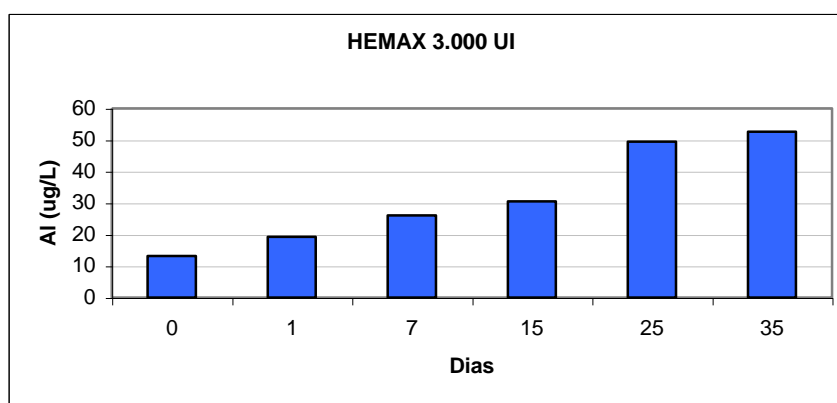


Figura 7: Al extraído do frasco-ampola pelo medicamento *Hemax*[®] em 35 dias

Na figura 7 pode-se observar que existe interação entre os componentes do medicamento e o alumínio proveniente do vidro, uma vez que o medicamento reconstituído apresentou teor crescente de alumínio com o passar do tempo.

4.2.1 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas constituintes do medicamento por meio de coletas de frações após separação cromatográfica

Depois de realizadas as medidas do alumínio total nas amostras iniciou-se o estudo da interação do alumínio com a rhEPO e albumina humana por meio de coletas de frações por HPLC e posterior medida por GF AAS, com o objetivo de verificar se as frações referentes aos picos cromatográficos da rhEPO e albumina humana apresentam aumento significativo de alumínio em comparação com as frações correspondentes a outros picos cromatográficos existentes no cromatograma da amostra e a regiões do cromatograma onde não existem picos.

O alumínio é conhecido por participar da patogênese de doenças associadas com a hemodiálise crônica como a osteodistrofia e encefalopatia, tem sido proposto também seu envolvimento no sistema nervoso central, como causador da doença de Alzheimer [LARINI, 1987].

A importância do estudo da interação do alumínio com as proteínas constituintes do medicamento, albumina e eritropoetina, vem do fato delas serem possíveis transportadoras de alumínio no corpo humano e deste medicamento ser usado por pacientes com insuficiência renal. Mais de 90% do alumínio no soro normal e urêmico é não dialisável o que sugere ligações com proteínas do sangue [FAVARATO et al. 1992].

Diversos pesquisadores estudaram a distribuição do alumínio no soro humano por cromatografia de exclusão molecular (SEC) por meio de coletas de frações com posterior medida por espectrometria de absorção atômica. Embora as conclusões diverjam com relação ao número de proteínas, identidade e quantidade relativa de ligação de alumínio-proteína, a maioria dos trabalhos identifica a albumina e a transferrina como as maiores acceptoras de alumínio adicionado no soro *in vitro*. No soro de indivíduos normais e urêmicos o alumínio foi encontrado por existir primeiramente como complexo alumínio-proteína, mas foi ainda sugerido que podem existir complexos de alumínio com ânions inorgânicos e pequenos polipeptídios, uma vez que o alumínio livre não foi detectado [TRAPP, 1983; KING et al., 1982; BERTHOLF et al., 1985; FAVARATO et al., 1992].

A seguir estão representados os cromatogramas das amostras analisadas, obtidos pelo método otimizado e validado no presente trabalho.

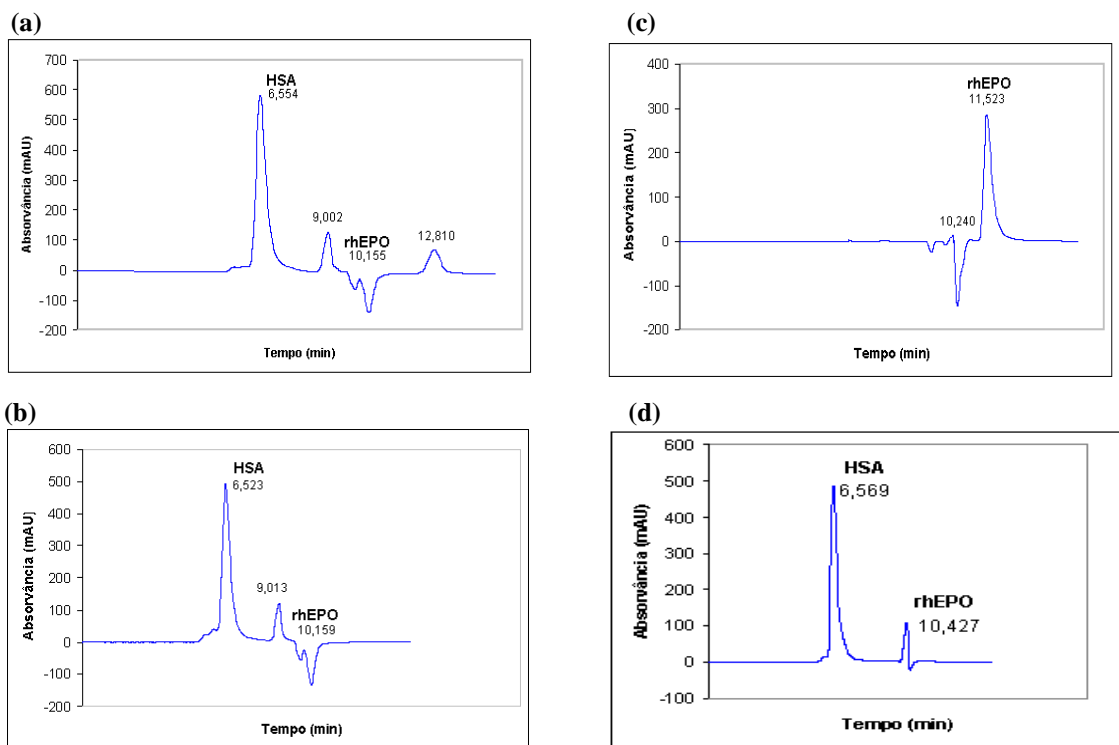


Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPLC (rhEPO=eritropoetina humana recombinante e HSA=albumina do soro humano): a) Alfaepoetina® b) Eritropoetina® c) Recormon® d) Eritropoetina recombinante (2° padrão internacional 2003) NIBSC. Para diluições de 1/10 dos medicamentos. Condições cromatográficas: Coluna BioSep-SEC S2000 Phenomenex (300 x 7,8 mm de d.i.;5µm); fase móvel: acetato de sódio 40mM pH 7,30; vazão 1mL min⁻¹; volume injetado: 100µL

De acordo com a figura 8, pode-se observar que os cromatogramas das amostras apresentam perfis semelhantes, porém o medicamento Recormon® apresenta o pico da rhEPO deslocado em comparação aos outros dois medicamentos e ao padrão. Acredita-se que isto se deve ao fato da forma farmacêutica ser a betapoetina e também aos excipientes que estabilizam a molécula de rhEPO que são na sua maioria aminoácidos e não há albumina em comparação com os outros medicamentos, como pode ser observado na tabela 15 item 4.2.

Trabalhos anteriores utilizando outros tipos de coluna de exclusão molecular e outros eluentes demonstraram que o alumínio apresenta interação com a fase estacionária, como pode ser visto na tabela 17.

Tabela 17: Alumínio ligado à coluna de exclusão molecular: coluna (16,0cm x 1,5 cm) empacotada com várias SEC, sendo o alumínio removido por lavagem com tampão contendo DFO. Foram injetadas quantidades iguais de cloreto de alumínio e as recuperações foram determinadas por GF AAS [FAVARATO et al.,1992]

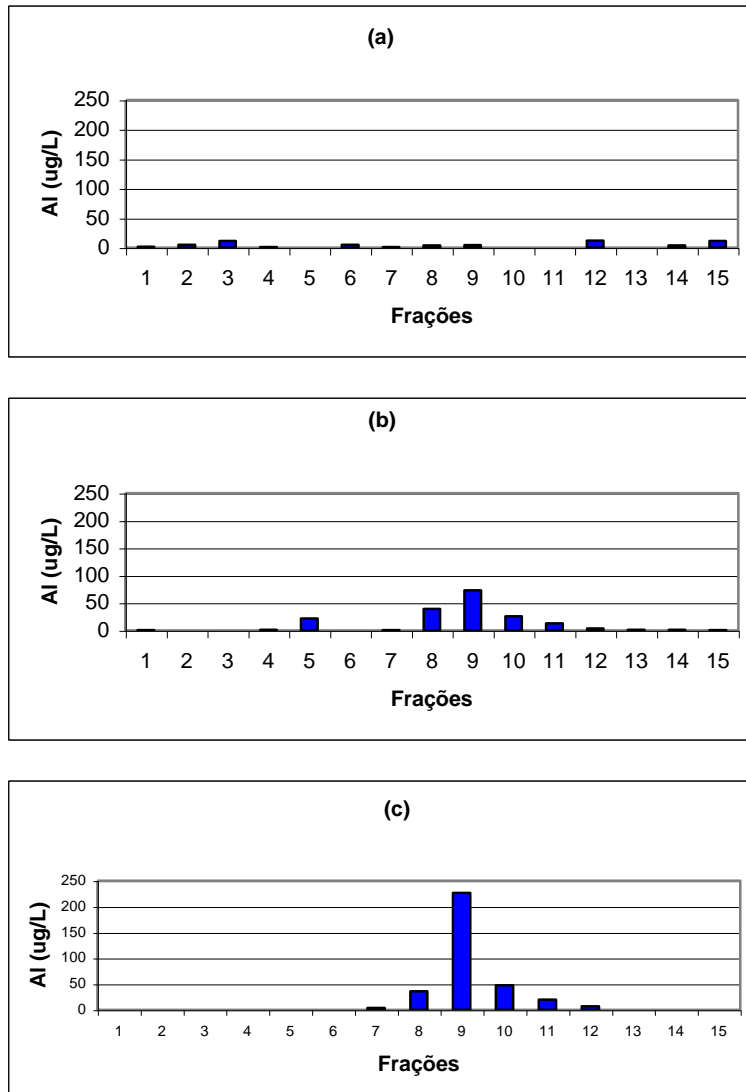
Coluna	Alumínio injetado (ng)	Alumínio recuperado (ng)	Recuperação (%)
Bio Gel P-2	125	30	24
Sphacryl S-500	125	37	30
Sephadex G-200	125	45	36
Toyopearl HW 55 (S)	125	94	75

Sendo assim, antes de iniciar o estudo de interação alumínio-proteína, realizou-se um teste para verificar a interação alumínio-fase estacionária da coluna cromatográfica. Preparou-se uma solução de 5 mg.L^{-1} de alumínio em água ultrapura e esta foi injetada no sistema cromatográfico, frações de 1 mL foram coletadas por um período de 120 minutos e o teor de Al em cada fração foi determinado por GF AAS. A finalidade da injeção do padrão de Al no sistema cromatográfico foi a de verificar o tempo de eluição do alumínio livre. Observou-se que somente na fração referente ao tempo de 99 minutos encontrou-se alumínio, na concentração de $104 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Concluiu-se que o alumínio interage com a fase estacionária da coluna cromatográfica, sendo assim, convencionou-se lavar a coluna com o eluente por um período mínimo de 12 horas a cada injeção de amostra adicionada de alumínio, sendo o branco das análises subseqüentes o eluido da coluna antes da injeção da amostra.

Posteriormente realizaram-se as injeções e coletas de frações das amostras *Alfaepoetina*[®] e *Eritropoetina*[®], ambas diluídas 1/10, sem a adição de alumínio e adicionadas de 5 mg.L^{-1} de alumínio com período de incubação de 16 horas em temperaturas de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A distribuição do alumínio foi similar nos dois medicamentos em estudo, como pode ser observado nas figuras 9 e 10, representadas abaixo, onde as frações de

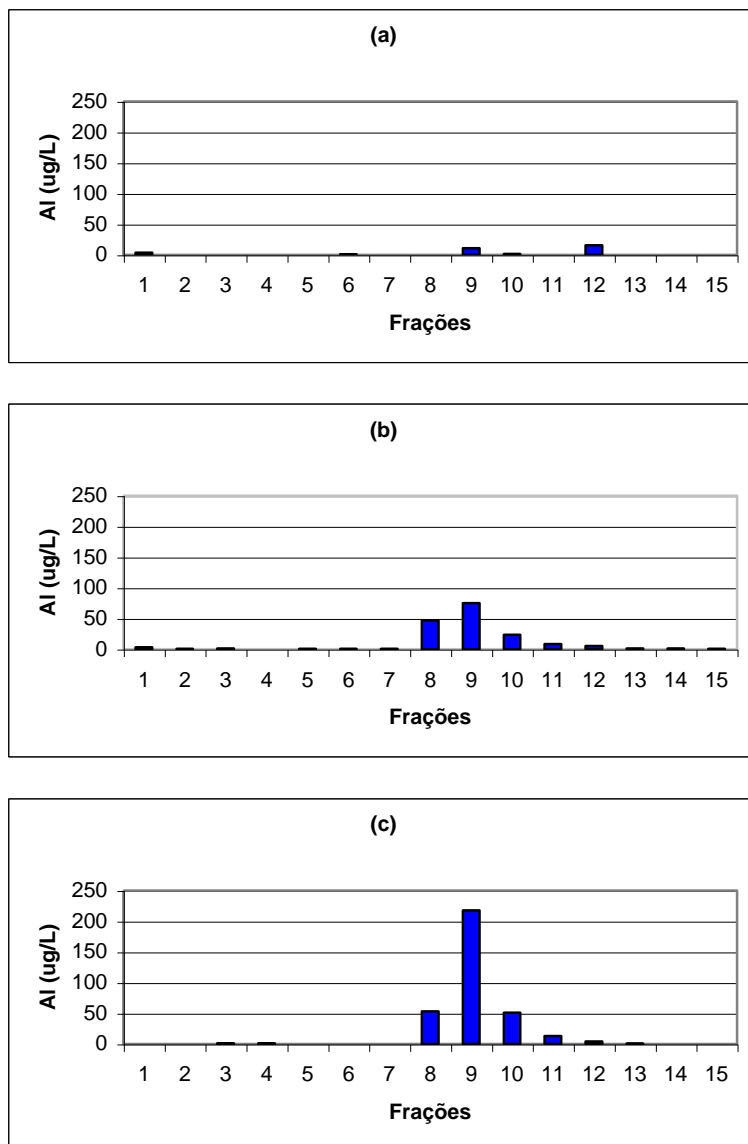
número 6 e 10 caracterizam respectivamente os picos cromatográfico da albumina humana e rhEPO. A fração número 9 foi a que apresentou maior aumento de alumínio em comparação as amostras sem adição do metal, porém a fração não corresponde a nenhuma das proteínas em estudo, portanto, o composto eluido neste tempo de retenção não foi identificado.



Legenda:

Frações	Tempo (min)
1	0-1
2	1-2
3	2-3
4	3-4
5	4-5
6	5-6
7	6-7
8	7-8
9	8-9
10	9-10
11	10-11
12	11-12
13	12-13
14	13-14
15	14-15

Figura 9: Alumínio determinado nas frações coletadas para *Alfaepoetina*® a) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10; b) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5 mg.L⁻¹ de Al a 4 °C por 16h; c) Alfaepoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L⁻¹ de Al a 37 °C por 16h



Legenda:

Frações	Tempo (min)
1	0-1
2	1-2
3	2-3
4	3-4
5	4-5
6	5-6
7	6-7
8	7-8
9	8-9
10	9-10
11	10-11
12	11-12
13	12-13
14	13-14
15	14-15

Figura 10: Alumínio determinado nas frações coletadas para Eritropoetina[®] a) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10; b) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L⁻¹ de Al a 4 °C por 16h; c) Eritropoetina 4.000 UI diluída 1/10 + 5mg.L⁻¹ de Al a 37 °C por 16h

Como podemos observar nas figuras 9 e 10 a presença da amostra faz com que o alumínio elua da coluna cromatográfica dentro do intervalo de tempo onde as proteínas são eluídas (15 min), fato que não ocorreu quando a solução aquosa de alumínio foi injetada, demonstrando que o alumínio interage com os componentes do medicamento.

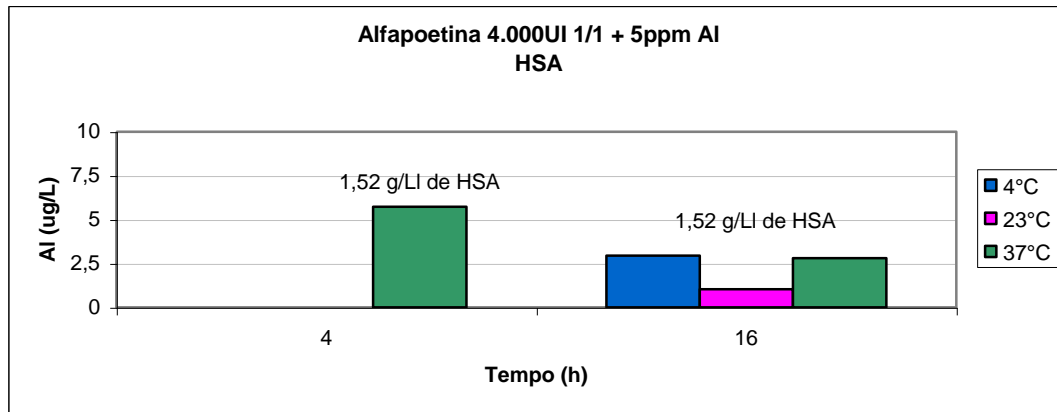
Na tabela 18 podem ser observados os resultados referentes ao alumínio determinado nas frações coletadas dos medicamentos *Alfaepoetina*[®] e *Eritropoetina*[®], os resultados demonstram haver maior interação do alumínio com a rhEPO, mesmo possuindo concentração inferior a albumina humana, e que temperatura maiores favorecem a interação.

Tabela 18: Distribuição do alumínio determinado nas frações coletadas dos medicamentos *Alfaepoetina*[®] e *Eritropoetina*[®]

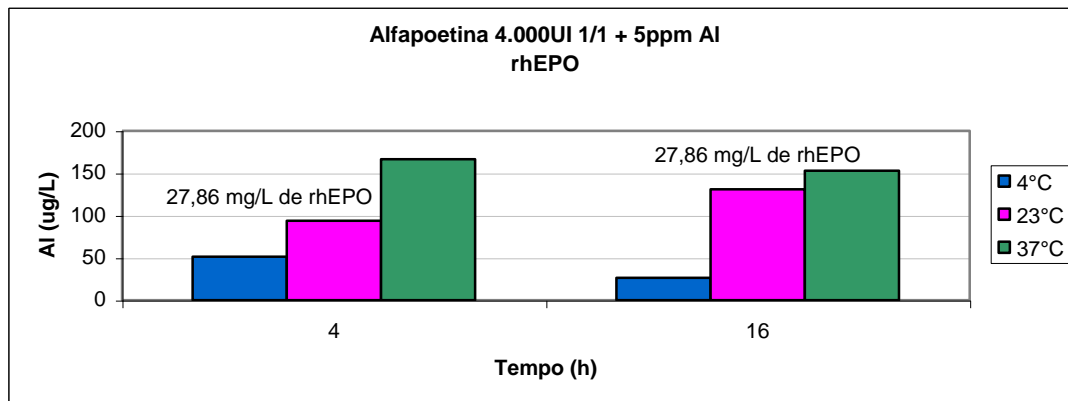
	4 °C			37 °C		
	Al total (µg.L ⁻¹)	Al-rhEPO (µg.L ⁻¹)	Al-albumina (µg.L ⁻¹)	Al total (µg.L ⁻¹)	Al-rhEPO (µg.L ⁻¹)	Al-albumina (µg.L ⁻¹)
<i>Alfaepoetina</i> [®]	181,4	25,4	0,46	340,3	47,9	3,9
<i>Eritropoetina</i> [®]	168,2	23,5	0,34	340,7	51,2	n.d

O mesmo ensaio de coletas de frações foi realizado para a *Alfaepoetina*[®] e *Recormon*[®], com tempos de incubação de 4 e 16 horas a 4 °C, 23 °C e 37 °C, simulando respectivamente as temperaturas de armazenamento, ambiente e fisiológica. A *Alfaepoetina* 4.000 UI foi diluída 1/1 adicionada de 5 mg.L⁻¹ de alumínio nos tempos e temperaturas de incubação já estabelecidos, as amostras foram injetadas, frações foram coletadas e medidas por GF AAS, os resultados de alumínio ligado albumina e a eritropoetina encontram-se na figura 11 (a, b), o *Recormon* 10.000 UI foi diluído 1/10 e passou pelo mesmo processo que a *Alfaepoetina*[®], os resultados de alumínio ligado a eritropoetina encontram-se na figura 11 letra (c).

(a)



(b)



(c)

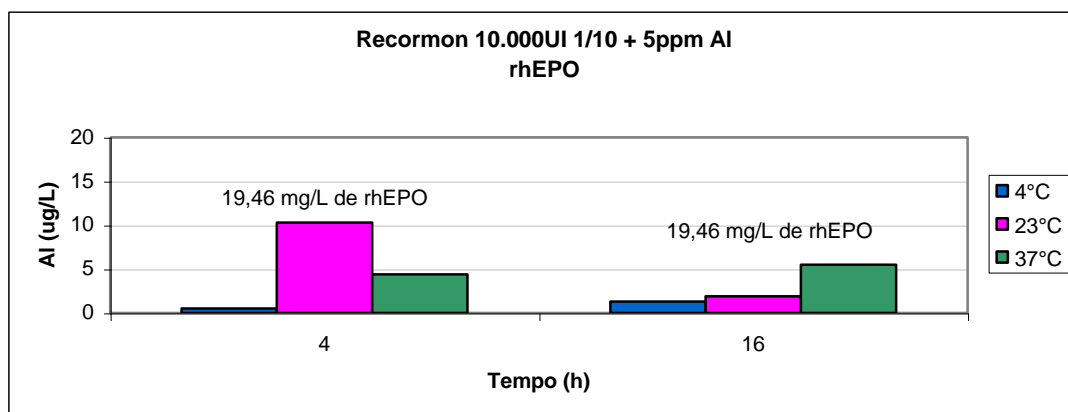


Figura 11: Alumínio determinado nas frações obtidas nos tempo de retenção da albumina humana e rhEPO para *Alfaetina*[®] e *Recormon*[®] a) Alfaetina: Al que interagiu com a albumina humana; b) Alfaetina: Al que interagiu com a EPOrh c) Recormon: Al que interagiu com a rhEPO

Observando a figura 11 (a, b) percebemos que pelo método proposto realmente a eritropoetina, mesmo estando em menor concentração que a albumina no medicamento, apresenta maior interação com alumínio, sendo que em ambas a interação parece ser mais favorecida a temperatura de 37 °C no tempo de 4 horas de incubação.

Observando as figura 11 (b, c) vemos que a rhEPO no *Recormon*[®] interagiu menos com o alumínio em comparação a *Alfaepoetina*[®], isto pode ser devido a forma farmacêutica da rhEPO que no *Recormon*[®] é a betapoetina, ou aos diferentes excipientes que estabilizam a molécula, e ainda pode ser resultado da maior diluição do medicamento, uma vez que observando a figura 12 logo abaixo, vemos que a *Alfaepoetina*[®] apresentando concentração maior de rhEPO apresenta maior interação com o alumínio adicionado.

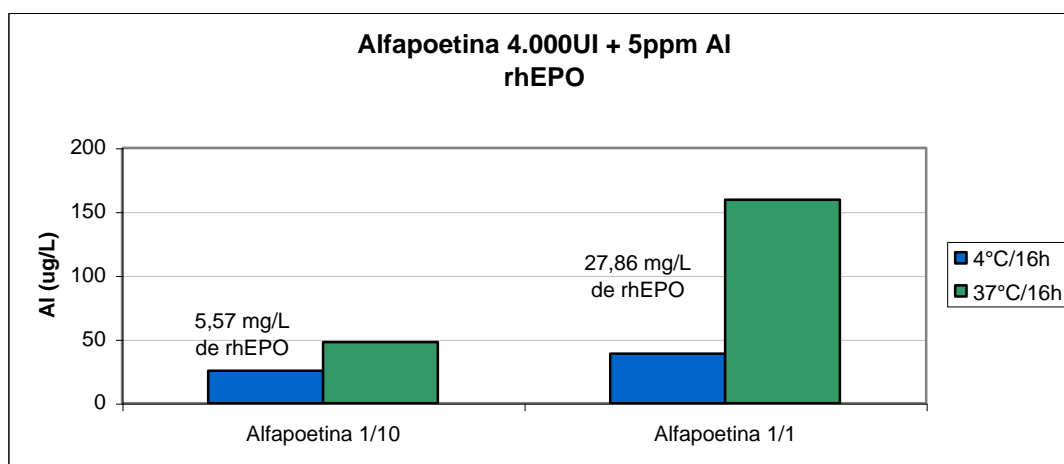


Figura 12: Alumínio determinado nas frações obtidas nos tempo de retenção da rhEPO para *Alfaepoetina*[®]: Al que interagiu com a rhEPO em um período de incubação de 16 horas a 4 e 37 °C

De acordo com a figura 12, pode-se observar que quanto maior a concentração de eritropoetina em solução maior é a quantidade de alumínio que eluiu da coluna junto a rhEPO, a 4 °C. A *Alfaepoetina*[®], diluída 1/10 apresentou 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de alumínio no tempo de retenção da rhEPO, enquanto a mesma amostra diluída 1/1 apresentou 38 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Na temperatura de 37 °C a interação foi maior. A amostra diluída 1/10 apresentou 48 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de alumínio referente ao pico da rhEPO e a amostra diluída 1/1 apresentou 159 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

De acordo com a literatura o número e a natureza da ligação de componentes do soro com o alumínio não são conhecidos com certeza. Presumivelmente a inabilidade dos métodos de cromatografia de exclusão molecular (SEC) para separar a albumina da transferrina contribui para falta de consenso da especiação de alumínio no soro humano e a disparidade das conclusões pesquisadas por vários grupos reflete a variação das amostras e metodologias, uma vez que a resolução na SEC é limitada pela falta de seletividade, disponibilidade de matrizes e a possibilidade de proteínas com massas diferentes dobrarem-se, assumindo dimensões similares [FAVARATO et al., 1992].

Os resultados encontrados no presente trabalho usando SEC com a coluna BioSep-SEC-S2000 demonstraram que a rhEPO apresenta maior interação com o alumínio que a albumina, o que parece concordar com outros trabalhos que sugerem a albumina e a transferrina como as maiores aceptoras do alumínio no soro *in vitro*, uma vez que a albumina interage com o alumínio adicionado. Porém devido à falta geral de informação em relação aos complexos alumínio-proteína, principalmente em relação à eritropoetina, e a diferenças nas condições experimentais é difícil avaliar a extensão que o erro sistemático afeta os resultados, uma vez que os resultados podem ser afetados por fatores limitantes como perda de alumínio dos complexos durante a cromatografia e a formação de complexos com outros constituintes do medicamento que possuem baixa massa molecular e que não foram determinados por este tipo de cromatografia.

4.2.2 Contribuição dos diferentes constituintes na contaminação por alumínio de formulações farmacêuticas de eritropoetina recombinante humana

O objetivo desta parte do trabalho foi investigar a interação entre cada um dos constituintes das formulações farmacêuticas de rhEPO com o recipiente de vidro e a tampa de borracha que constituem a embalagem da maioria das formas de apresentação do medicamento.

A investigação da contribuição da embalagem como uma das origens da contaminação das formulações de rhEPO foi realizada por dois ensaios distintos: o primeiro foi verificar o efeito do processo de esterilização e o segundo verificar o efeito do tempo de armazenagem na contaminação destas soluções.

4.2.2.1 Influência da esterilização na extração de alumínio da embalagem

Este ensaio teve por objetivo mostrar a contribuição do processo de esterilização na contaminação das soluções por alumínio proveniente do vidro e da tampa que constituem a embalagem do medicamento. Foram preparadas soluções de cada um dos constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana, estas foram envasadas individualmente e esterilizadas (item 3.7). A concentração de alumínio foi determinada antes e depois do processo de esterilização das soluções.

Como as soluções foram preparadas em meio aquoso, realizou-se a esterilização para amostra de água de injeção (comercial, com pH ajustado a 7,30), água ultrapura e de água ultrapura com o pH ajustado a 7,32, uma vez que todas as soluções passaram pelo ajuste de pH.

A figura 13 mostra o alumínio extraído do vidro e da tampa de borracha pelas amostras de água, antes e após o processo de esterilização.

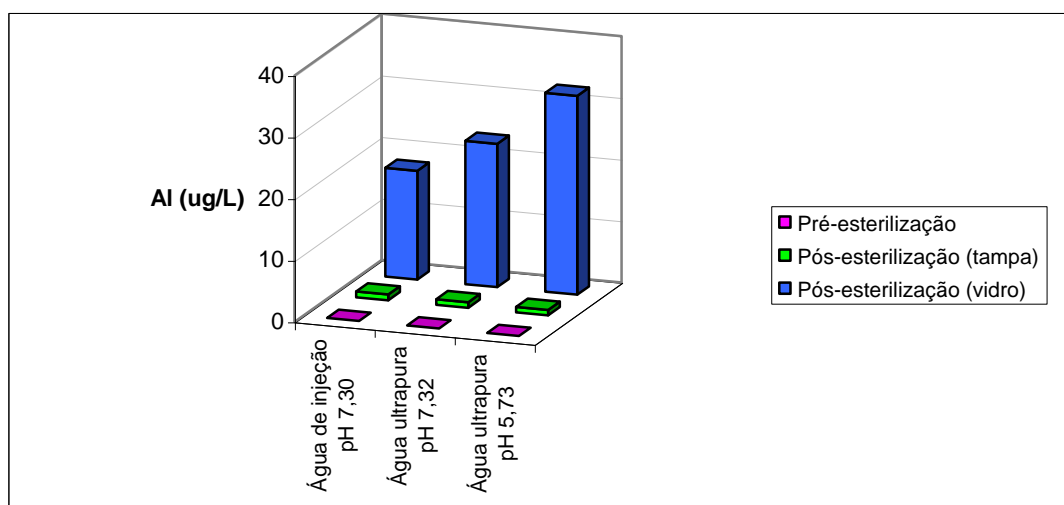


Figura 13: Al extraído do vidro e da tampa antes e depois do processo de esterilização pelas amostras de água

Na figura 13 pode-se observar que houve extração de alumínio tanto da tampa de borracha quanto do vidro após a esterilização das amostras de água, porém a extração do alumínio da tampa foi baixa e similar entre as amostras, já a extração do alumínio do vidro excedeu a da tampa. Observa-se também a influência

do pH, pois a água ultrapura (pH 5,73) que não passou pelo ajuste de pH extraiu $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ de alumínio a mais que a água ultrapura com pH ajustado a 7,32. Já observando a água de injeção comercial, vê-se que apesar de possuir o pH ajustado em valor similar ao da água ultrapura, extraiu quantidade menor de alumínio do vidro.

Na figura 14 estão representadas as quantidades de alumínio extraído do vidro e da tampa de borracha para as soluções de aminoácidos e proteínas.

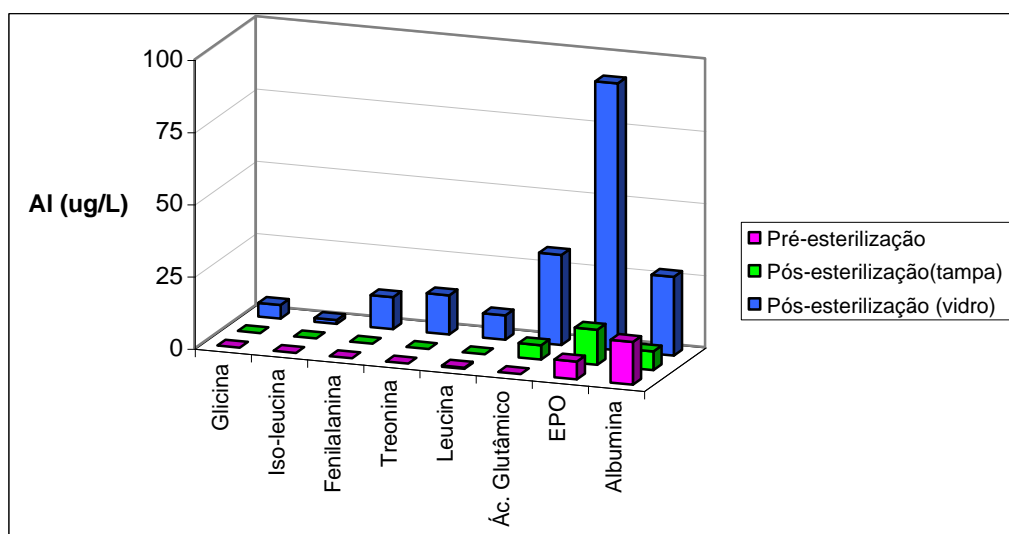


Figura 14: Al extraído pelas soluções de aminoácidos e proteínas antes e após a esterilização

Observando a figura 14 é possível constatar que a contaminação por alumínio das soluções de aminoácidos e proteínas aumenta após o processo de esterilização, ou seja, o aumento da temperatura acelera o processo de extração de alumínio do vidro e em algumas soluções o das tampas de borracha.

Podemos observar que a eritropoetina extraiu mais alumínio que a albumina apesar das diferentes concentrações em que encontram-se nas soluções, $0,184 \text{ mg.L}^{-1}$ de rhEPO e 50 mg.L^{-1} de albumina, o que é concordante com os resultados encontrados nas coletas de frações onde o alumínio adicionado interage em maior quantidade com a rhEPO e em temperaturas a maiores. O aminoácido que mais extraiu alumínio do vidro foi o ácido glutâmico, acompanhado em ordem crescente de extração pela treonina, fenilalanina, leucina, glicina e iso-leucina, sendo que

somente o ácido glutâmico extraiu alumínio da tampa de borracha. Porém observa-se que o ácido glutâmico foi o único aminoácido que extraiu alumínio da tampa e do vidro em quantidade superior a da água ultrapura com pH ajustado, seguido da albumina e eritropoetina.

A capacidade dos aminoácidos em atuarem como ligantes para íons metálicos está relacionada não só a presença dos grupo amino e carboxílico mas também aos outros grupos funcionais presentes em suas cadeias laterais, assim a cadeia lateral dá ao aminoácido a sua identidade, assegurando diversas classificações como polaridade, acidez e basicidade. Entretanto, como os grupos são diferentes em sua natureza, a capacidade dos aminoácidos de se ligarem a metais também é diferente [PEARSON, 1968].

Os aminoácidos podem apresentar-se na forma carregada ou neutra dependendo do pH do meio no qual se encontram. O pH usado neste estudo foi de 7,30, portanto, todos os aminoácidos estão carregados negativamente, como podemos observar pela tabela 19. Entre os aminoácidos o ácido glutâmico teve a maior interação com o Al proveniente do vidro e da tampa o que se deve ao fato deste aminoácido apresentar um segundo grupo carboxílico. Em estudo sobre especiação de alumínio em fluídos biológicos Daydé et al. utilizaram a glicina, representando aminoácido apolar, serina, histidina e treonina como aminoácidos com cadeias laterais polares e o ácido glutâmico, concluíram que o grupo carboxila extra, presente no ácido glutâmico, faz com que ele apresente capacidade superior aos outros aminoácidos de manter o Al em solução [DAYDÉ et al., 2003].

Tabela 19: Valores de pKas para os aminoácidos em estudo

Aminoácido	Grupamento α - COOH	Grupamento α - NH ₃ ⁺	Cadeia lateral
Leucina	2,3	9,7	
Iso-leucina	2,3	9,7	
Fenilalanina	2,2	9,3	
Treonina	2,0	9,1	
Glicina	2,3	9,8	
Ácido glutâmico	2,2	9,9	4,4

Os outros excipientes também extraíram quantidades relevantes de alumínio do vidro e em alguns casos da tampa de borracha como pode ser observado na figura15.

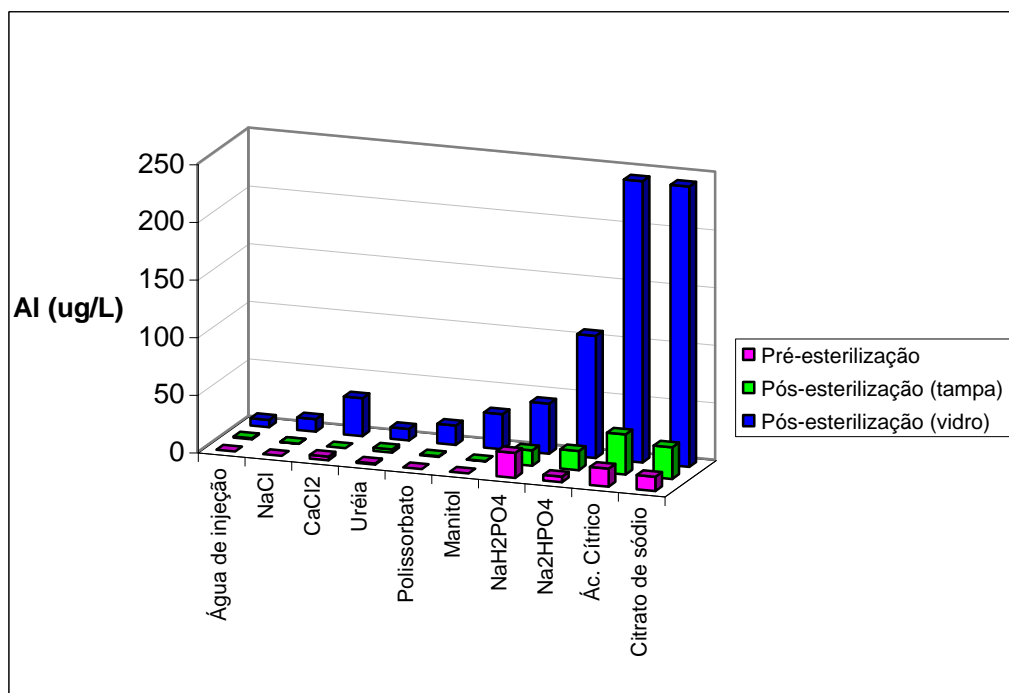


Figura 15: Al extraído pelas soluções de outros excipientes antes e após a esterilização

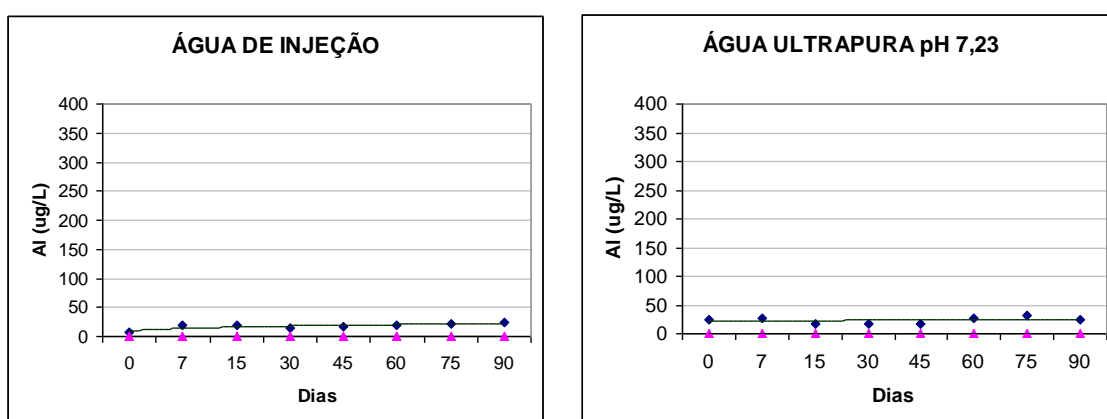
Na figura 15 está representada a quantidade de alumínio extraído do vidro e da tampa de borracha pelas as soluções de excipientes que não são aminoácidos e proteínas. Em todas as soluções observa-se interação com a superfície da embalagem, liberando maiores ou menores quantidades de alumínio, devido à natureza das soluções. Os resultados mais significativos foram os do ácido cítrico e do citrato de sódio, que extraíram respectivamente $244 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $243 \mu\text{g.L}^{-1}$ de alumínio do vidro e $35 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $28 \mu\text{g.L}^{-1}$ de alumínio da tampa, sendo os pKas do ácido cítrico pKa_1 : 3,1, pKa_2 : 4,7 e pKa_3 : 6,4, conclui-se que o mesmo encontra-se na forma de citrato.

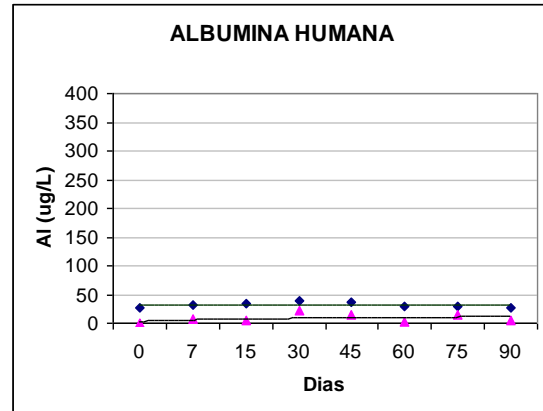
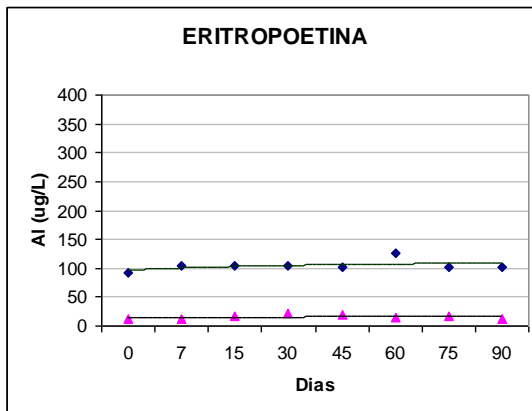
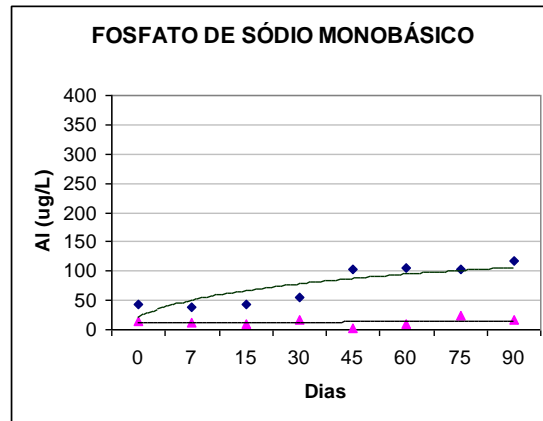
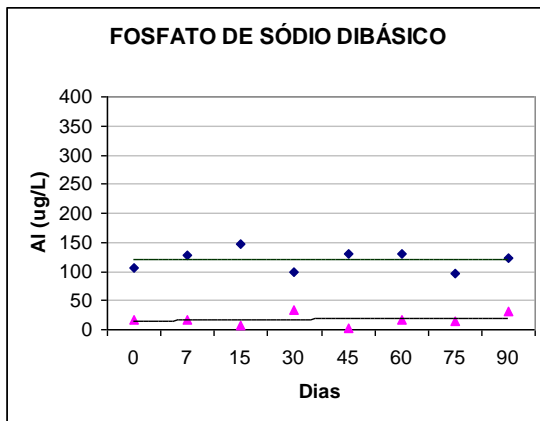
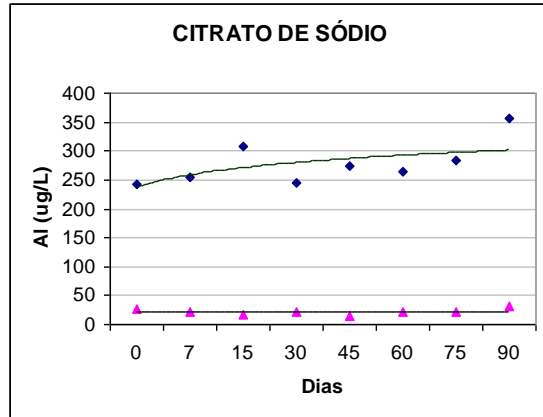
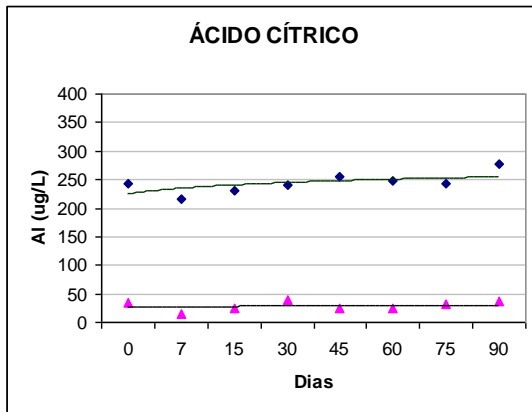
Observa-se novamente que nem todas as soluções retiraram quantidades superiores de alumínio do vidro e da tampa em comparação com a água ultrapura

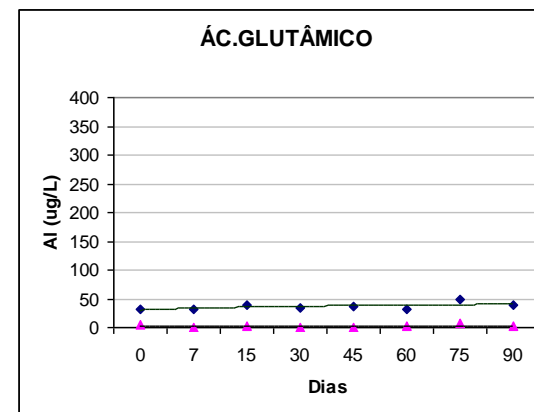
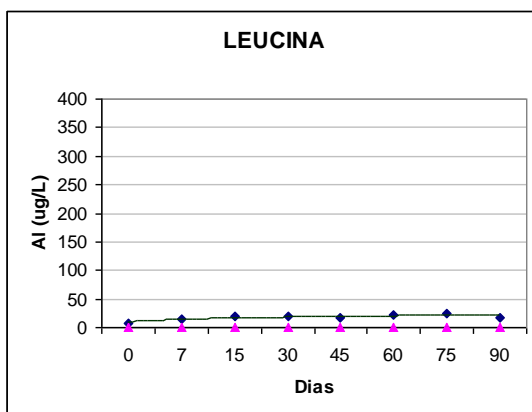
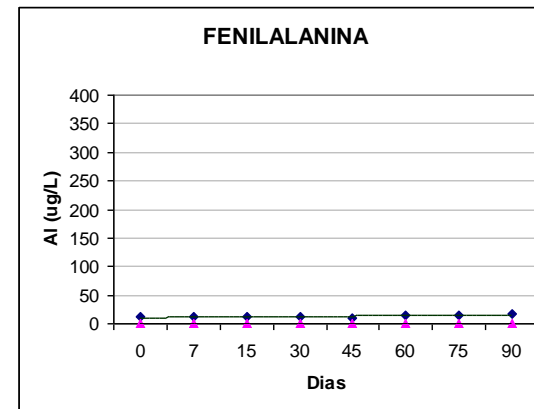
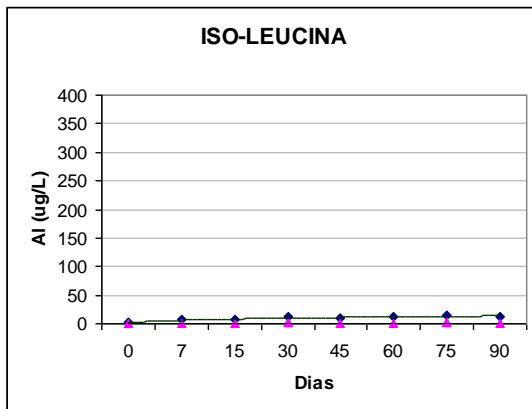
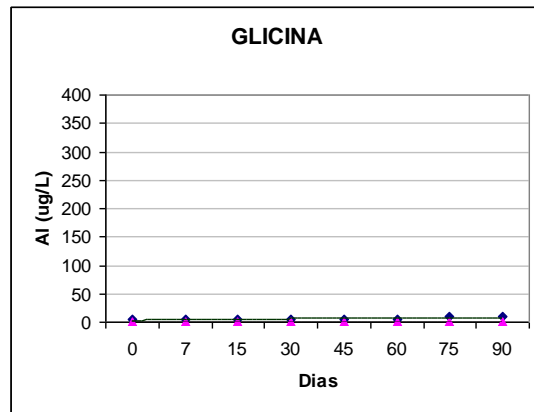
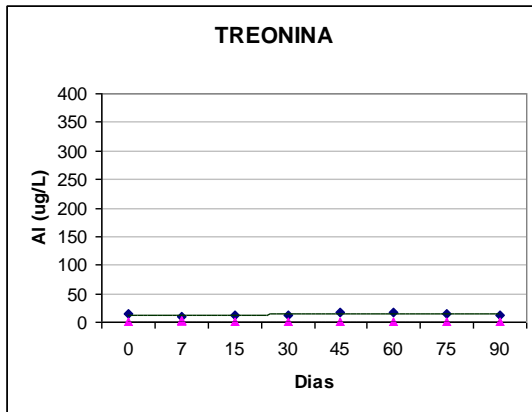
pH 7,32. As soluções que retiraram quantidades maiores de alumínio que a água ultrapura foram em ordem crescente de concentração extraída: manitol, cloreto de cálcio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, citrato de sódio e ácido cítrico. Porém pode-se observar que todas as soluções apresentaram aumento de alumínio após a esterilização, confirmando que com aumento da temperatura acelera o processo de extração do alumínio, tanto o extraído do vidro quanto da tampa, sendo sempre a extração do vidro superior a da tampa, o que também se deve ao fato da quantidade de alumínio na tampa ser menor que no vidro e a maior superfície de contato da solução com o vidro.

4.2.2.2 Avaliação da interação do alumínio com eritropoetina e excipientes do medicamento por um período de 90 dias (ensaio de armazenamento)

Neste ensaio descrito no item 3.7, soluções de todos os constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana foram armazenadas em frasco de vidro e em frasco plástico com a tampa de borracha imersa. A quantidade de alumínio das soluções foi determinada ao longo de 90 dias. Na figura 16 estão os resultados da extração do alumínio pelas soluções.







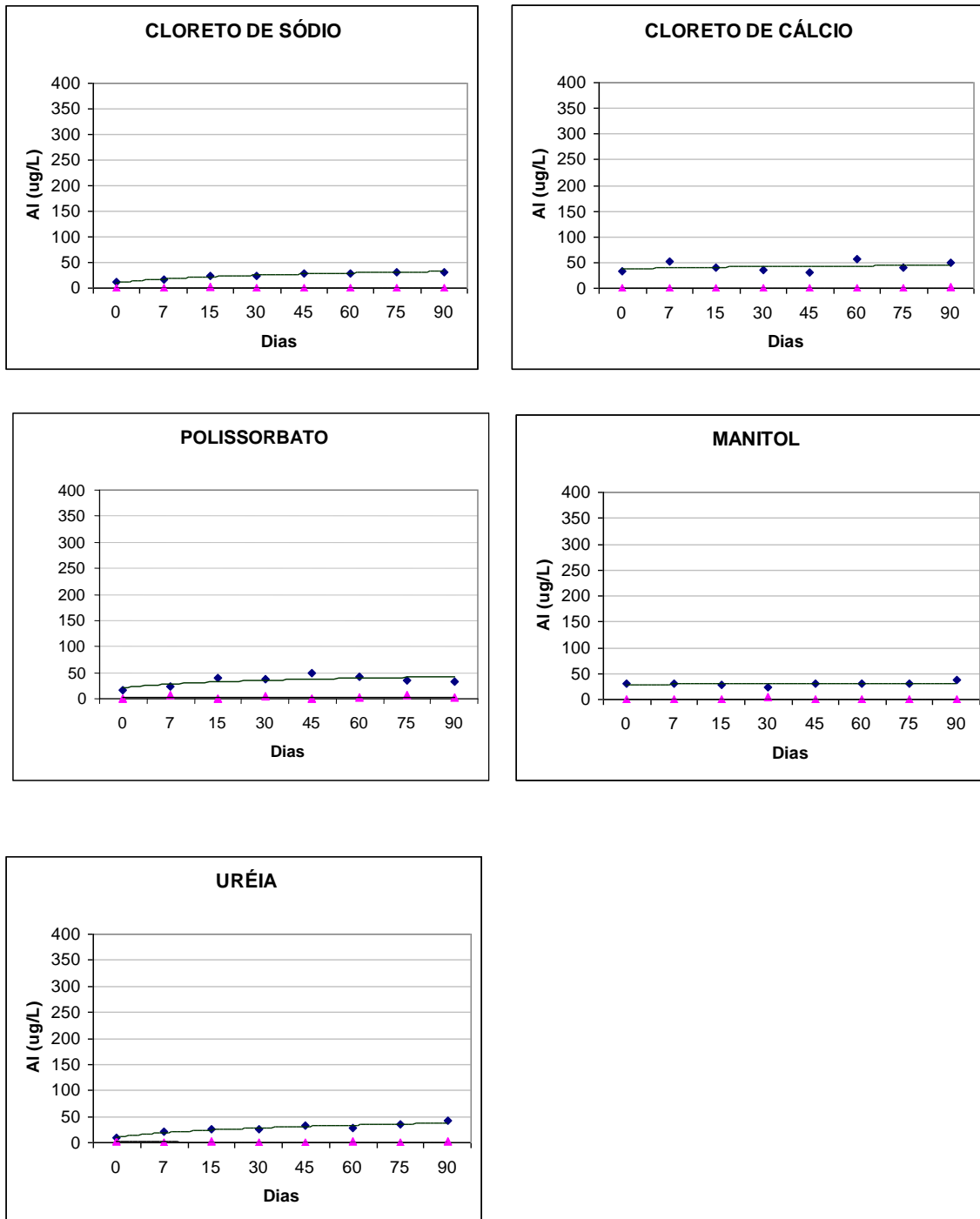


Figura 16: Al extraído pelos constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana em 90 dias: (■) alumínio extraído do vidro, (▲) alumínio extraído da tampa de borracha

Na da figura 16 pode-se observar que em todas as substâncias existe uma tendência a estabelecer equilíbrio entre o alumínio na solução e na superfície do vidro.

O ácido cítrico e citrato de sódio foram os excipientes que mais extraíram alumínio tanto do vidro quanto da tampa, seguidos pelo fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico.

A eritropoetina ($0,184 \text{ mg.L}^{-1}$) mesmo apresentando concentração inferior a albumina (50 mg.L^{-1}) retirou três vezes mais alumínio do vidro e duas vezes mais alumínio da tampa de borracha.

Todos os aminoácidos extraíram alumínio do vidro, sendo o ácido glutâmico o aminoácido que mais extraiu alumínio do vidro e da tampa, extraindo praticamente o dobro que a leucina e fenilalanina, e o triplo que a treonina, iso-leucina e glicina.

Apesar da água de injeção extrair menos alumínio que a água ultrapura no processo de esterilização, ambas apresentaram comportamento e extração de quantidades semelhantes de alumínio no ensaio de armazenagem.

As soluções de uréia, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, manitol e polissorbato extraíram quantidades semelhantes de alumínio, comparáveis ao ácido glutâmico e a albumina, porém superiores a todos os outros aminoácidos e bem inferiores a eritropoetina, ao ácido cítrico, ao citrato de sódio e aos fosfatos.

Quando comparada à extração de alumínio da superfície do vidro por todas as soluções com a extração de alumínio pela água ultrapura, observa-se que a maioria dos aminoácidos extrai menos alumínio, o ácido glutâmico, o cloreto de sódio, a uréia, o polissorbato, o manitol e a albumina extraem quantidade de alumínio pouco maior que a água ultrapura, já a eritropoetina, o ácido cítrico, o citrato de sódio e os fosfatos extraem quantidades bem maiores de alumínio que a água ultrapura.

Fazendo um apanhado geral dos resultados, pode-se constatar que neste estudo a extração do alumínio da superfície do vidro e da tampa de borracha não pode ser relacionada ao pH, já que todas as soluções possuem pHs ajustados em valores semelhantes.

Os resultados mostram que o ácido cítrico, o fosfato de sódio dibásico e o monobásico extraíram quantidades elevadas de alumínio do vidro, tanto no ensaio de armazenamento, quanto no da esterilização, pois são agentes complexantes. O ataque ao vidro pelos agentes complexantes já foi descrito em 1959, onde foram estudados o EDTA, catecol e fosfato de sódio em função do tempo e da temperatura, e foi comprovado que a presença de agentes quelantes aumenta a velocidade de ataque ao vidro pelas soluções [ERNSBERGER,1959]. A atuação do

EDTA segundo Ernsberger é indiscutivelmente seqüestrar os íons alumínio para formar complexos solúveis, sendo assim realizou-se o ensaio de armazenamento para o EDTA, apesar dele não ser um dos excipientes das formulações de rhEPO, mas por ser um complexante conhecido para o alumínio.

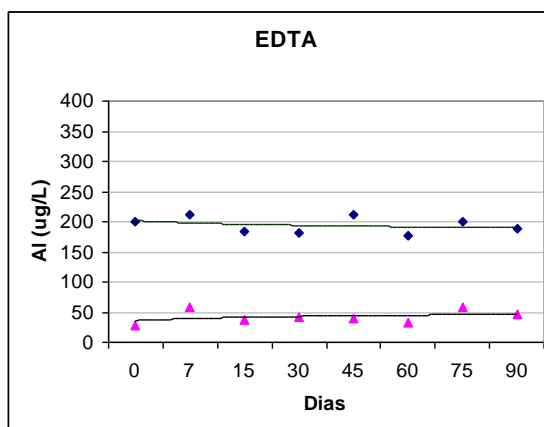


Figura 17: Al extraído pelo EDTA em 90 dias: (■) alumínio extraído do vidro, (▲) alumínio extraído da tampa de borracha

Na figura 17 observamos que o EDTA realmente extrai quantidades elevadas de alumínio do vidro e da tampa da mesma forma que o ácido cítrico e o fosfato de sódio, como podem ser observados na figura 16.

O citrato de sódio também retirou o alumínio do vidro em quantidades superiores a maioria dos outros excipientes, segundo Bacon e Raggon que estudaram o efeito de soluções neutras de citrato de sódio sobre a superfície do vidro, o citrato têm o mesmo efeito que soluções alcalinas sobre a superfície do vidro, ou seja, há dissolução do vidro [BACON & RAGON,1959]. Já Leung et al. estudaram a especiação do complexo alumínio-citrato no soro por HPLC-GFAAS demonstrando que o citrato é capaz de deslocar o alumínio ligado a outros constituintes do soro não identificados, além de grandes proteínas, e que forma complexos com este metal in vitro, possivelmente de natureza coloidal. Na presença de ácidos orgânicos como o citrato e o lactato o alumínio aparece na forma de complexos com diferentes níveis de substituição, dependendo do pH [LEUNG et.al.,1987].

Todos os aminoácidos extraíram alumínio do vidro, porém em baixas quantidades com exceção do ácido glutâmico, o que provavelmente ocorre é a formação de complexos destes aminoácidos com o alumínio, uma vez que o mecanismo não pode ser considerado um processo de troca iônica como ocorre para o cloreto de sódio e cloreto de cálcio, onde os cátions da solução podem ser trocados com os cátions da superfície do vidro.

O modo mais comum de coordenação de aminoácidos envolve a formação de quelatos, os modos de coordenação, entretanto variam com a natureza do aminoácido e do íon metálico, assim como em função do pH. A coordenação dos aminoácidos aos íons metálicos pode ocorrer de duas maneiras: no caso de íons duros, a coordenação se dá preferencialmente pelo carboxilato, já no caso dos íons moles, a coordenação se dá por meio do enxofre da cisteína ou da metionina [TOMA, 1984]. A definição de íons duros e moles é de 1963, quando Ralph G. Pearson descreveu a interação entre ácidos e bases de Lewis, respectivamente íons metálicos e ligantes [TOMA, 1984]. Segundo sua classificação, íons duros possuem pequeno raio e grande carga, não possuem pares de elétrons livres na camada de valência, tem alta eletronegatividade e baixa polarizabilidade de nuvem eletrônica. Os ligantes duros não estão com suas densidades eletrônicas polarizadas, por isso a combinação de ambos, íons metálicos e ligantes duros formam complexos estabilizados por força eletrostática. Já íons moles possuem grande raio e pequena carga, têm pares de elétrons não compartilhados na camada de valência (elétrons p ou d) são altamente polarizados, por isso formam complexos estáveis com ligantes moles que também possuem nuvem eletrônica polarizada, aumentando assim o caráter covalente da ligação [PEARSON, 1968; PEARSON, 1968]

A teoria de Pearson de ácidos e bases duros e moles não elimina a possibilidade de interação de íons metálicos e ligantes de classificação diferentes, mas os complexos formados serão de baixa estabilidade. Existem íons e ligantes que possuem uma classificação intermediária, ou seja, interagem tanto com espécies duras como moles.

São conhecidas muitas constantes de estabilidade de complexos formados entre aminoácidos e íons metálicos de metais de transição, porém com o alumínio, apenas os complexos com os ácidos aspártico e glutâmico são conhecidos [SMITH, MARTEL, 1998]. Portanto, é possível que a quelação seja a interação que acontece entre os aminoácidos e a superfície do vidro.

Em termos de proporção, todos os constituintes das formulações de eritropoetina extraíram mais alumínio do vidro do que da tampa de borracha, devido à quantidade de alumínio na tampa ser menor que no vidro e também a maior superfície de contato da solução com o vidro, porém quando comparados os resultados em termos de percentagens, observamos que a extração de alumínio pelas soluções foi muito semelhante para o vidro e borracha, como pode ser visto na figura 18.

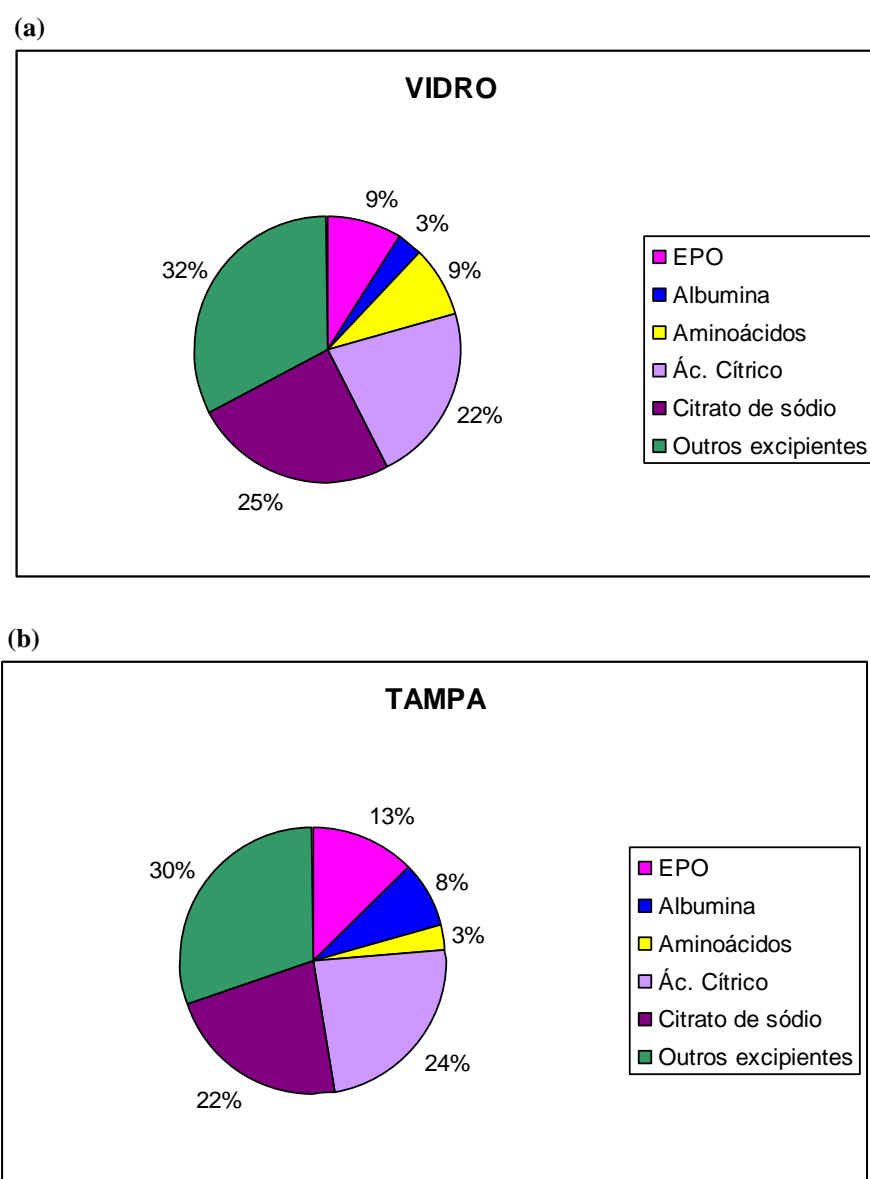


Figura 18: Percentagem de alumínio extraído pelos constituintes das formulações de eritropoetina recombinante humana: a) média de Al extraído do vidro em 90 dias, b) média de Al extraído da tampa em 90 dias

Na figura 18 tem-se uma visão geral da contribuição da rhEPO e dos excipientes na contaminação do medicamento, observa-se que os excipientes que não são aminoácidos e proteínas extraíram quantidades proporcionais de alumínio do vidro e da tampa de borracha, o que também ocorreu para a rhEPO. Os aminoácidos extraíram quantidades maiores de alumínio do vidro que da tampa de borracha, por outro lado, tanto a rhEPO quanto a albumina humana extraíram mais alumínio da tampa o que pode ser devido à forte interação que existe entre proteínas e superfícies poliméricas. As proteínas, devido às suas propriedades anfífilas, são muito ativas em superfícies poliméricas [SUZAWA, 1991; SZLEIFER,1997]. A adsorção das proteínas na superfície da tampa promove um maior contato e conseqüentemente a extração de uma maior quantidade de alumínio.

Também podemos observar na figura 18 que a rhEPO extrai quantidades superiores de alumínio tanto da tampa quanto do vidro em comparação a albumina humana, ressaltando que esta em concentração inferior. Sendo assim, a maior contribuição para contaminações das formulações de rhEPO, provêm dos excipientes usados para estabilizar o fármaco, pois somente cerca de 10% do alumínio extraído esta relacionado ao composto ativo no medicamento.

4.2.3 Avaliação da interação do alumínio com as proteínas constituintes do medicamento por meio de ultrafiltração

A ultrafiltração possibilita a remoção de proteínas e outras macromoléculas dos fluídos biológicos, é um importante método para a determinação de espécies “livres” no soro ou no plasma, isto é, analitos que não estão ligados a proteínas ou macromoléculas [LEUNG et al., 1985].

Neste procedimento a amostra passa por uma membrana em forma de disco que apresenta uma porosidade controlada de modo a deixar passar apenas moléculas de massa molecular inferior à capacidade de retenção da membrana. Desta forma, se o analito de interesse estiver ligado as proteínas, ficará retido na membrana, portanto, a ultrafiltração também é uma excelente ferramenta para o estudo de especificação de algum analito que se apresente ligado as proteínas.

O objetivo deste estudo foi o de comprovar se na fração ultrafiltrada a concentração de alumínio sofre uma diminuição devido ao fato do alumínio ligar-se a eritropoetina e a albumina e assim poder estimar quanto de alumínio interage com as proteínas no medicamento. Para isso, foram utilizadas membranas de 50 kDa que separa a albumina da eritropoetina e 10 kDa que separa ambas proteínas da fração de Al livre. Na figura 19 estão representados os resultados das amostras ultrafiltradas e também do padrão de eritropoetina.

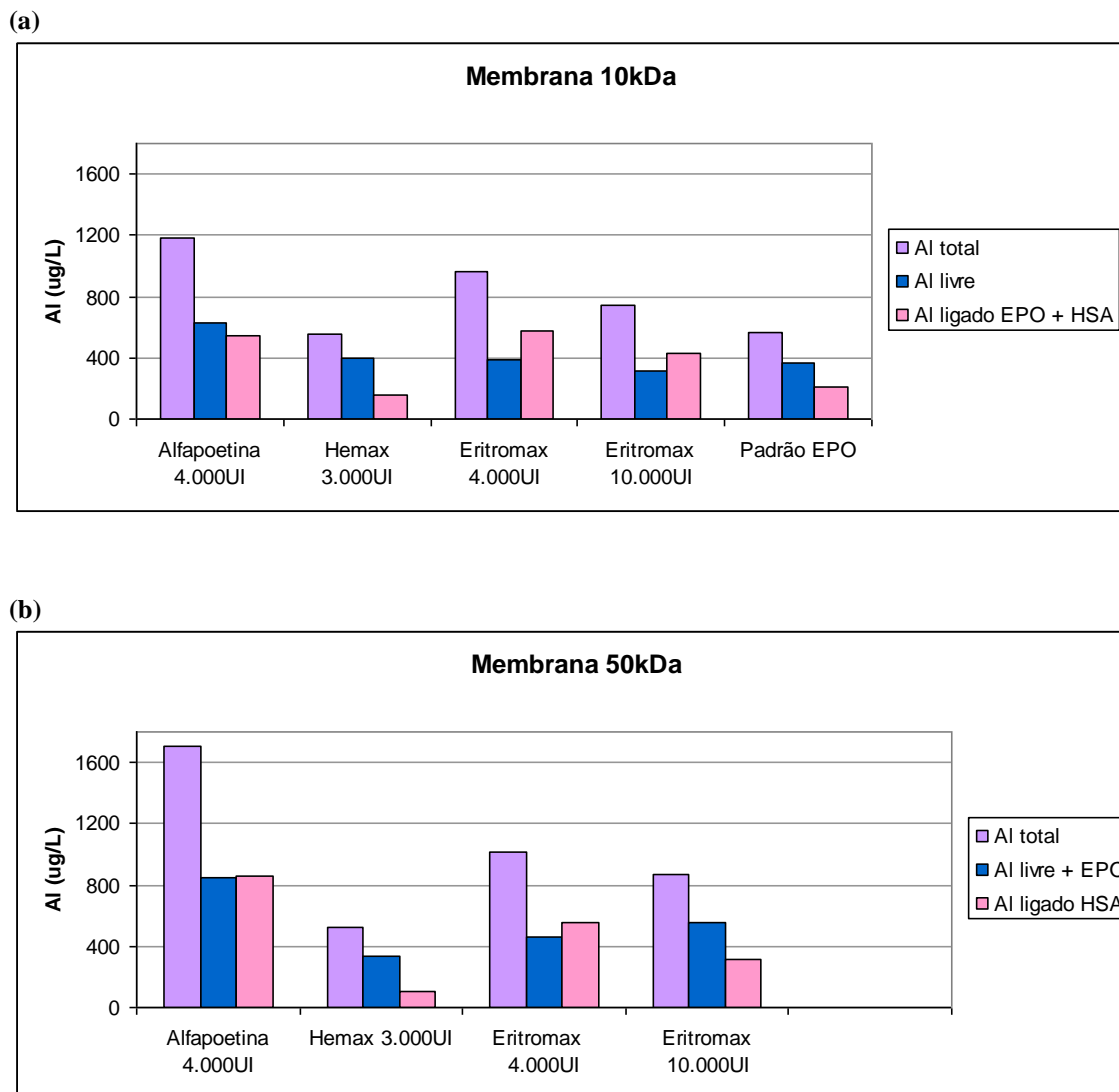


Figura 19: Alumínio determinado nas amostras e no padrão de rhEPO (24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) adicionadas de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al. a) ultrafiltração em membrana de 10kDa, b) ultrafiltração em membrana de 50kDa. Onde o Al total corresponde à amostra adicionada de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Al sem a ultrafiltração.

Como podemos observar na figura 19 todas as amostras antes de serem ultrafiltradas apresentaram concentração de alumínio superior a $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ o que se deve a contaminação por alumínio já existente nos medicamentos e também no padrão de eritropoetina. Também podemos observar que tanto na membrana de 10 kDa como na de 50 kDa a fração de alumínio livre não é correspondente ao alumínio total presente nas amostras, o que indica interação do alumínio com as proteínas presentes no medicamento, uma vez que todos os outros excipientes fazem parte da constituição da fração de Al livre, pois atravessam a membrana. Para as amostras dos medicamentos Hemax 3.000 UI, Eritromax 4.000 UI e Eritromax 10.000 UI a fração de alumínio ligado com as proteínas é um pouco superior para a membrana de 10 kDa em relação à de 50 kDa, o que era esperado devido ao fato desta membrana separar a eritropoetina e a albumina da fração de Al livre, enquanto a membrana de 50 kDa separa a albumina da fração de Al livre e eritropoetina. Pela figura 19 (letra a) podemos observar, ainda, que a eritropoetina (padrão EPO) quando presente sem a presença da albumina e outros excipientes do medicamento apresenta grande afinidade pelo o alumínio.

5. CONCLUSÕES

Na primeira parte desse trabalho foi investigada a interação existente entre alumínio-albumina e alumínio-eritropoetina em formulações farmacêuticas de rhEPO, através do desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico de exclusão molecular, com posterior coletas de frações para determinação do alumínio por GF AAS.

Os resultados encontrados demonstraram que a rhEPO apresenta maior interação com o alumínio que a albumina, porém devido à falta geral de informação em relação aos complexos alumínio-proteína, principalmente em relação à eritropoetina, é difícil avaliar a extensão em que esta interação ocorre em comparação à outras proteínas. Há ainda a possibilidade de formação de complexos com outros constituintes do medicamento que possuem baixa massa molecular e afinidade pelo alumínio, mas que não são detectados por este tipo de separação cromatográfica.

Realizou-se também a investigação da contribuição de cada constituinte do medicamento na contaminação por alumínio através de ensaios de esterilização e armazenagem. A embalagem utilizada para formulações de eritropoetina contribui para a contaminação das soluções por alumínio, tanto o processo de esterilização como o tempo de armazenagem influenciam no aumento da contaminação. Apesar do ensaio com a tampa de borracha ter apresentado extração de alumínio deste material, talvez não seja uma fonte importante de contaminação, pois as tampas, a princípio não ficam em contato direto com o medicamento durante a sua armazenagem.

Em cada tipo de solução provavelmente ocorre um mecanismo diferenciado de liberação de alumínio do vidro, como troca iônica no caso dos sais e complexação por substâncias que possuem esta propriedade. De uma maneira ou de outra todas as soluções interagem com a superfície da embalagem de vidro, levando a contaminação destas por alumínio.

A diferença dos níveis de alumínio entre as formas farmacêuticas pó liofilizado e solução demonstram claramente a origem do alumínio nestas formulações e permitem sugerir que, para os pacientes renais, tão suscetíveis a toxicidade do alumínio, o pó liofilizado deveria ser a forma de escolha.

6. REFERÊNCIAS

AHRER, K.; JUNGBAUER, A. Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. **Journal Chromatography B**, v. 844, p.110-122, 2006.

ALUMÍNIO E SAÚDE. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO ALUMÍNIO (ABAL). Disponível em: <<http://www.abal.org.br>>. Acesso em: 10 dezembro 2008.

AVIS, K. E.; LACHAMAN, L.; LIEBERMAN, H. A. **Pharmaceutical dosage forms: Parenteral Medications**, v. 2, Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1986.

BACON, F.R.; RAGON, F.C. Promotion of Attack on Glass and Silica By Citrate and Other Anions in Neutral Solution, **J.American Ceramic Society**, v.42, nº 4, p.199-205,1959.

BARTH, T.; SANGOI, M.S. ; DA SILVA, L.M. et al. Assessment of rhEPO in pharmaceutical formulations by reversed-Phase Liquid chromatography method and bioassay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p.1277-1288, 2007.

BENTO, R.M.A.; DAMANESCO, L.M.P.; AQUINO NETO, F.R. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina no Esporte**, v.9, nº3, p.169-180, 2003.

BEQUET, D.; PAILLER, F.M.; CORBE, H. Aluminum, hypothetic cause of Alzheimer Disease, **Presse Med.**, v.24, p. 489-490, 1995.

BERTAGNOLLI, D.C., **Migração de metais por interação das embalagens com soluções parenterais**, Tese de Doutorado, UFSM, 2008.

BERTHOLF, R L.; WILLS, M.R.;SAVORY, J.; Evaluation of equilibrium gel filtration chromatography for the study of protein binding of aluminum in normal and uremic sera.**Clin. Physiol. Biochem.**,v.3, p. 271-276, 1985.

BIETLOT, H. P.; GIRARD, M. Analysis of recombinant human erythropoietin in drug formulations by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.759, p.177-184, 1999.

BINOTTO, R., **Investigação sobre a origem da contaminação por alumínio em soluções de nutrição parenteral**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2001.

BOHRER,D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, et al. Contributions of the raw material to the aluminum contamination in parenterals. **J. Parenter Enter Nutr**, v. 26, p. 382-388, 2002.

BOHRER,D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, R. et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical product by aluminum. Part I: Salts, glucose, heparin and albumin. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 15, p. 95-101, 2001.

BOHRER,D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, R. et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical product by aluminum. Part I: Salts, glucose, heparin and albumin. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 15, p. 95-01, 2001.

BOHRER,D.; DO NASCIMENTO, P. C.; BINOTTO, R. et al. Influence of the glass packing on the contamination of pharmaceutical product by aluminum. Part III: Interaction container-chemicals during the heating for sterilisation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 17, p. 107-115, 2003.

BOHRER, D.; BERTAGNOLLI, D.C.; OLIVEIRA, S.M.R. et al. Drugs as hidden source of aluminum for chronic renal patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p. 605-611, 2007.

BOHRER, D.; BERTAGNOLLI, D.C.; OLIVEIRA, S.M.R. et al. Role of medication in the level of aluminum in the blood of chronic haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, p. 1277-1281, 2009.

BOOS, H.J.; WATSON, D. B.; RUSH, R. S. Peptide capillary zone electrophoresis mass spectrometry of recombinant human erythropoietin: an evaluation of analytical method. **Electrophoresis**, v.19, n°15, p.2654-2664, 1998.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em < [http:// www.anvisa.gov.br/](http://www.anvisa.gov.br/) Acesso em: 14 janeiro 2009.

BRASIL. Portaria n° 518, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar 2004. Disponível em: < http://www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf>. Acesso em: 14 janeiro 2009.

BRASIL. Portaria n°1179 de 17 de junho de 1996. Determina a lista de denominações comuns brasileira. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, n° 116, p. 10707-10742, 18 de junho de 1996. Seção 1.

BRISTOW, A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin . **Pharmeuropa**, v.2, p.31-38, 1997.

BRISTOW, A.; CHARTON, E. Assesment of suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining isoform distribution of erythropoietin. **Pharmeuropa**, v.11, n°2, p. 290-300, 1999.

BROWNE, J.K. et al. Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. **Cold Spring Harbor Symposio on Quantitative Biology**, v 51, p. 693-702, 1986.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. **Jounal of ChromatographyB**, v.689, p.175-180, 1997.

CHEUNG, W. K.; GOON, B. L.; GUILFOYLE, M.C. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n°4, p. 412-423, 1998.

CHOI, D.; KIM, M.; PARK, J. Erythropoietin physico- and biochemical analysis. **Journal of chromatography B**, v. 687, p. 189-199, 1996.

CIFUENTES, A; MORENO-ARRIBAS, M.V.; DE FRUTOS, M.; DÍEZ-MASA, J.C. Capillary isoelectric focusing of erythropoietin glycoforms and its comparison with flat-bed isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. **Journal of chromatography A**, v. 830, p. 435-463, 1999.

DALLE, B. et al., Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietin activity in vitro and in vivo. **Blood**, v.97, n° 12, p. 3776-3782, 2001.

DALMORA, S. L. et al. Validation of an RP-LC method and assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by liquid chromatography and biological assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.29, p.1753-1767,2006.

DAYDÉ, S.; BRUMAS, V.; CHAMPMARTIM, D. et al. Aluminum speciation studies in biological fluids: Part 9. A quantitative investigation of aluminum(III)–glutamate complex equilibria and their potential implications for aluminum metabolism and toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 104-117, 2003.

DEPAOLIS, A. M.; ADVANI, J.V.; SHARMA, B. G. Characterization of erythropoietin dimerization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.84, n°11, p.1280-1284, 1995.

DERBY, P.L.; STRICKLAND, T.W.; ROHDE, M. F. et al. Identification of the residues involved in homodimer formation of recombinant human erythropoietin. **International journal of Peptide and Protein Research**, v.47, n°3, p.2001-208, 1996.

DICIONÁRIO de Especialidades Farmacêuticas. 34ª ed. Rio de Janeiro: JBM, 2005-2006.

DORDAL, M. S.; WANG, F. F.; GOLDWASSER, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. **Endocrinology**, v. 116, p. 2293-2299, 1985.

EDER, H.; ROBLENBROICH, B.; FAILING, K.A. Dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. **Blut**, p.184-187, 1989.

EGRIE, J.C. et al. Characterization and Biological effects of recombinante human erythropoietin. **Immunobiology**, v. 172, p. 213-224, 1986.

EGRIE, J.C.; BROWNE, J.K. Development and characterization of novel erythropoieses stimulating protein (NESP). **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, p. 3-13, 2001.

EGRIE, J.C.; DWYER, E.; LYKOS, M. et al. Novel erythropoieses stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo biological activity than recombinant human erythropoietin (rHuEPO). **Blood**, v. 90, p. 3-13, 2001.

ENDO, Y. et al. Heat-induced aggregation of recombinant erythropoietin in the intact and deglycosilated states as monitored by permeation chromatography combined with a low-angle laser light scattering technique. **Journal of Biochemistry**, v. 112, n°5, p. 7000-7006, 1992.

ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: An Integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.24. p. 755-767,2001.

ERNSBERGER, F.M., Attack of Glass by Chelanting Agents, **The American Ceramic society (Glass division)**, v.42, n°.8,p. 373-375, 1959.

EUROPEAN Pharmacopoeia 5. ed. Strasbourg:Council of Europe,p.1528-1532, 2005.

FAVARATO, M.; MIZZEN C.A.; MCLACHLAN, D.R. Resolution of serum aluminum-binding proteins by size-exclusion chromatography: identification of new carrier of aluminum in human serum. **Journal of Chromatography**, v. 576, p. 271-285, 1992.

FAVARATO, M.; MIZZEN C.A. Aluminum-binding serum proteins: desferrioxamine alters serum aluminum speciation, **Clin. Chim. Acta**, v. 2007, p. 41-57, 1992.

FREY, O.R.; MAIER, L. Polyethylene vials of calcium gluconate reduce aluminum contamination of TPN, **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, p. 811-812, 2000.

FUKUDA, M. N.; SASAKI, H.; LOPEZ, L. et al. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: The role of carbohydrates. **Blood**, v.73, n°1, p.84-89, 1989.

GARMATZ, J.C. **Determinação de metais como contaminantes em formulações de eritropoetina empregando métodos voltamétricos**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2007.

GILG, D.; RIEDL, B.; ZIER, A.; ZIMMERMANN, M.F. Analytical methods for the characterization and quality control using erythropoietin as an example. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v.71, p. 3116-3121, 1996.

GOKANA, A.; WINCHENNE, J.J.; BEN-GHANEM, A. et al, Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms. **Journal of Chromatography A**, v.791, p.109-118, 1997.

GOLWASSER, E.; KUNG, C.-H.; ELIASON, J. On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, n°13, p. 4202-4206, 1974.

GREGER, J. L.; SUTHERLAND, J.E. Aluminum exposure and metabolism. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34(5), p. 439-474, 1997.

GUNTURI, S. R.; CHOBRIAL, I.; SHARMA, B. Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantification of recombinant human erythropoietin in (r-HuEPO) aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.213-221, 2007.

HASELBECK, A. Epoetins: differences and their relevance to immunogenicity. **Current Medical Research and Opinion**, v. 19, n°5, p. 430-432, 2003.

HERNÁNDEZ, P.; NIETO, O.; HERNÁNDEZ, L. Determinação of recombinant human erythropoietin by square wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, p. 340-346, 1995.

HOSOKAWA, S.; YOSHIDA, O. Effect of erythropoietin on trace elements in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. **Nephron**, v. 65, p. 414-417, 1993.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of analytical procedures:methodology**. ICH Steering Committee, 1996.

ICH. **International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use:Text on Validation of Analytical Procedures**. ICH Steering Committee, 1994.

JACOBS, K.; SHOEMAKER, C.; RUDERSDORF, R. et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. **Nature**, v. 313, p. 806-810, 1985.

KING, S.W., SAVORY, J., WILLS, M.R.; Aluminum distribution in serum following hemodialysis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 12 p. 143- 149, 1982.

KLEIN, G. L. Aluminum: new recognition of an old problem. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 637-640, 2005.

KLEIN, G. L., ALFREY, A.C., SHIKE, A., Parenteral drug products containing aluminum as an ingredient or a contaminant: response to FDA notice of intent, **American Journal Clinical Nutrition**, v.53, p. 399-402, 1991.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 6ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

LAI, P.-H.; EVERETT, R.; WANG, F.-F. Structural characterization of human erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, nº7, p. 3116-3121, 1986.

LANGE, J.; Rohstoffe der Glasindustrie3. **Uberarb Auft - Leipzig; Stuttgart: Dt. Verl. Für Grandstoffindustrie**, 1993.

LARA-QUINTANAR, P. et al. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 227-234, 2007.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, p.135-143, 1987.

LASNE, F.; CEARRIZ, J. Recombinat erythropoietin in urine. **Nature**, v. 405, p. 635, 2000.

LEE, S.H. et al. Trace metals' abnormalities in hemodialysis patients: relationship with medications. **Artificial Organs**, v. 24, n. 11, p. 841- 844, 2000.

LEUNG, F.Y., Trace elements in parenteral micronutrition. **Clinical Biochemistry**, v. 28, nº6, p. 561-566, 1995.

LEUNG, F.Y.; BRADLEY, C.; HERDERSON, A.R.; Speciation studies of serum aluminum/citrate complex by liquid chromatography-furnace AAS. **The Science of the Total Environment**, v.71, p. 49-56, 1998.

LEUNG, F.Y; HODSMAN, A.B.; MUIRHEAD, N. et al. Ultrafiltration studies in vitro of serum aluminum in dialysis patients after deferoxamine chelation therapy. **Clin. Chem.**, v.31, n°1, p. 20-23, 1985.

LIMA, D. **Manual de Farmacologia clínica, Terapêutica e Toxicologia**. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1992.

LIN, F.K.; SUGGS, S.; LIN, C.H.; BROWNE, J.K. et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. **Proc Natl Acad Sci USA 1985**, v.82, n° 22, p. 7580-7584, 1985.

LOCATELLI, F.; DEL VECCHIO, L. Dialysis adequacy and response to erythropoietic agents: what is the evidence base?. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 29-35, 2003.

LOCATELLI, F.; DEL VECCHIO, L.; ANDRULLI, S. Dialysis: its role in optimizing recombinant erythropoietin treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, p. 29-35, 2001.

LÓPEZ-SOTO-YARRITU. P. et al. Comparison of different capillary electrophoresis methods for analysis of recombinant erythropoietin glycoforms. **Journal of separations Science**, v.25, p.1112-1118, 2002.

LUYKX, D. M. A.M.; et al. High-performance anion-exchange chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to determine erythropoietin in pharmaceutical products. **Journal of Chromatography A**, v.1078, p.113-119, 2005.

MACDOUGALL, I.C., Optimizing the use of erythropoietic agents-pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, p. 66-70, 2002.

MARTINS, P., **Estudo da interação entre alumínio e aminoácidos que compõem soluções de nutrição parenteral**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2000.

MEHTA, A.C. Quality management in drug. **Analyst**. v. 122, p. 83-88,1997.

MENDONÇA, J.K.A., **Interação do alumínio com ânions de baixo peso molecular e alguns dos aminoácidos presentes no sangue**. Tese de Doutorado, UFSM, 2003.

MERIAN, E., **Metals and Compounds in the Environment**, VCH Publishers, Inc., New York, 1991.

MIRE-SLUIJS, A. R.; et al. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biologicals**, v.24, p.351-362, 1996.

NEUSÜß, C.; DEMELBAUER, U.; PELZING, M. Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v.26, p.1442-1450, 2005.

NORTE, L.C., **Avaliação da utilização de membranas de troca-iônica na purificação de eritropoetina recombinante humana**. Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

PAVANETTO, F. ; GENTA, I. ; CONTI, B. ; MODENA, T.; MAONTANARI, L., Aluminum, cadmium and lead in large volume parenterals contamination levels and sources, **Int J. Pharm**, v.85, n° 2, p. 143, 1989.

PEARSON, R.G., Hard and Soft Acids and Bases, HSBA, Part I **J. Am. Chem. Soc.**, v 45, n° 9, p. 581-587, 1968.

PEARSON, R.G., Hard and Soft Acids and Bases, HSBA, Part II, Underlying theories, **J. Am. Chem. Soc.**, v 45, n° 10, p. 643-648, 1968.

PEARSON, R.G., Hard and Soft Acids and Bases, **J. Am. Chem. Soc.**, v 85, n° 22, p. 3533-3539, 1963.

PLUHATOR-MURTON, M.M ; FEDORAK, R.N. ; AUDETTE, R.J.; et al.Trace element contamination of total parenteral nutrition 2. Effect of storage duration and temperature, **J. Parenteral Enteral Nutrition**, v. 23, n°4, p. 228-232, 1999.

RADEMACHER, T.W.; PAREKH, R. B; DWEK, R. A. Glycobiology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 785-838, 1988.

RAMOS, A.S. et al. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n°11, p.1561-1569, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H. et al.Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**,v. 27 n° 5, p. 771-780,2004.

RIBELA, M. T. C. P. et al. HPLC analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.2, p.103-126, 2006.

SANZ-NEBOT, V. et al. Separation of recombinant human erythropoietin glycoforms by capillary electrophoresis using volatile electrolytes. Assessment of mass spectrometry for the characterization of erythropoietin glycoforms. **Analytical Chemistry**, v.75, n°19, p.5220-5229, 2003.

SASAKI, H. BOTHNER B.; DELL, A.; FUKUDA, M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.36, n°10, p. 1731-1735, 1990.

SHARPLES, E.J.; THIEMERMANN, C.; YAQOOB, M. M. Novel applications of recombinant erythropoietin. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, p.184-189, 2006.

SKIBELI, V.; NIELSEN-LIE, G.; GAINES, P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. **Blood**, v.98, p. 26-34, 2001.

SKOOG, D. A. West, D. M. Holler, F.J. **Fundamentals of analytical Chemistry**, seventh edition, Saunders College Publishing, USA, 1997.

SMITH, R. M. MARTEL, A.E.; **NIST Criticly selected Stability Constants of Metal Complex Database**, 1998.

STORRING, P.L.; Assaying glycoprotein hormones – the influence of glycosylation on immunoreactivity . **Tibtech**, v.10, p.427-432, 1992.

STORRING, P.L.; TIPLADY, R.J.; GAINES DAS R. E. et al. Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoforms compositions and biological propertier. **British Journal Haematology**, v.100, p.79-85, 1998.

SUZAWA, T.; SHIRAHAMA, H. Adsorption of plasma proteins onto polymer lattices. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 35, p. 139-172, 1991.

SZLEIFER, I; Polymers and proteins: interactions at interfaces. **J. coll.Int.Sci** 190 (2) p.437-448,1997.

TOMA, H.E., **Química Bioinorgânica**, Universidade de São Paulo, São Paulo 1984.

TRAN, A.D. et al. Separation of carbohydrate – mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives. **Journal of Chromatography A**, v.542, n° 2, p.459-471, 1991.

TRAPP, G.A.; Plasma aluminum is bound to transferrin. **Life Sci.**, v 33, p. 3111-316, 1983.

TSUJI, K. Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel and replaceable polymer-filled capillary electrophoresis for mass determination of proteins of pharmaceutical interest. **Journal of Chromatography b**, v.662, p.291-299,1994.

USP 28. The United States Pharmacopeia. Rockville. United States Convention Inc, 2005.

VANHOLDER, R. et al. Pain at the injection site of subcutaneous administered erythropoietin in maintenance hemodialysis patients: a comparison of two brands of erythropoietin. **American Journal of Nephrology**, v. 12, p. 68-72, 1992.

VANHOLDER, R. et al. The role of trace elements in uraemic toxicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 2, p. 2-8, 2002.

WATSON, E.; YAO, F. Capillary electrophoretic separation of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) glycoforms. **Anal. Biochem.**, v.210, n...2, p.389-393,1993.

WILHELM, M.; HOELZER, J.; LUEBBERS, K. et al. aluminum balance in intensive care patients. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 14, p. 223-227, 2001.

WINEARLS, C.G. Recombinant erythropoietin: 10 years of clinical experience. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p.3-8, 1998.

YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n°4, p. 350-357, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)