

ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DOSEAMENTO DE PROTEÍNA EM PREPARAÇÕES DE IMUNOGLOBULINA HUMANA INTRAVENOSA

RITA MACHADO DA CRUZ AZEVEDO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

***Estudo Comparativo de Métodos de Doseamento
de Proteína em Preparações de Imunoglobulina
Humana Intravenosa***

Dissertação de Mestrado

de

Rita Machado da Cruz Azevedo

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.



Orientador na FEUP: **Professor Filipe José Menezes Mergulhão**

Orientador no Infarmed: **Mestre Luís Meirinhos Soares**



Departamento de Engenharia Química

Setembro de 2017

“The best way to have a good idea is to have a lot of ideas.”

- Linus Pauling

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador no Infarmed, Mestre Luís Soares, pela orientação e instrução de conhecimentos, assim como toda a disponibilidade e ajuda ao longo do desenvolvimento do projeto.

Ao meu orientador na FEUP, Professor Filipe Mergulhão, pela orientação, conhecimentos transmitidos e disponibilidade provida.

A todos os colaboradores do Infarmed, em especial à Doutora Ana Isabel Galvão, à Doutora Ana Luísa Urmal, à Doutora Célia Figueiredo, à Doutora Elisabete Bértolo, à Doutora Isabel Pereira, à Doutora Fátima Almeida, à Doutora Irene Leal, ao Doutor Luís Ventura, à Doutora Mónica Miranda e à Doutora Sofia Gonçalves, um muito obrigada pela formação fantástica e pela preciosa ajuda em consolidação de conhecimentos, bem como pelo ótimo acolhimento e carinho.

Aos meus pais e à minha irmã, pela paciência, esforço e dedicação que demonstraram, e por toda a ajuda, motivação e educação instruída ao longo destes 5 anos.

À minha família, por me ajudarem financeira e psicologicamente durante todo este percurso.

Ao meu grupo de amigos ao longo destes 5 anos de curso, em especial à Ana, André, Catarina, Cristiana, Inês, Paula, Tiago e Sofia, por me terem acompanhado em todas as etapas e por terem feito com que este percurso passasse a correr e sempre na melhor companhia.

À Inês, por compreender a minha ausência em alguns momentos, e por estar sempre ao meu lado, principalmente nesta etapa. À Rita, que me acolheu tão bem em Lisboa e esteve sempre comigo quando precisei. A todos os meus amigos, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos de Lisboa pela hospitalidade e pela amizade.

A ti João, por todo o amor demonstrado e por toda a cumplicidade, bem como pelo apoio e compreensão por não ao teu lado na etapa mais importante do teu percurso, muito obrigada por tudo.

Muito obrigada!

Resumo

Uma vez que ainda não existe um método padrão universal para doseamento em Imunoglobulinas humanas, o presente trabalho teve como objetivo a realização de um estudo comparativo de vários métodos de doseamento, em ambiente de Controlo de Qualidade e de Libertação Oficial de Lote de Medicamentos derivados do plasma humano no Infarmed.

Deste modo, procedeu-se à quantificação de proteínas pelo método de Kjeldahl, método do Biureto, método de Lowry e Absortividade Molar, realizando-se um estudo preliminar da possibilidade de utilização de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para doseamento de proteínas. Para isso, recorreu-se a preparações de Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG), um anticorpo presente no sangue produzido através de plasma humano, e a Albumina de Soro Bovino (BSA) NIST (*National Institute of Standards & Technology*) como substância padrão, uma vez que é um Material Padrão de Referência (SRM).

Procedeu-se à validação do método de Kjeldahl, avaliando-se parâmetros específicos como a exatidão e a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), sendo que para os restantes métodos se estudaram critérios específicos de aceitação dos ensaios.

Relativamente aos resultados obtidos para o método de Kjeldahl, os valores determinados foram muito próximos dos teóricos. Para o método do Biureto somente se obteve resultados válidos para Imunoglobulinas. Quanto ao método de Lowry obteve-se resultados satisfatórios apenas para soluções de Albumina, sendo que para Imunoglobulinas se obtiveram valores bastantes superiores aos especificados pelo produtor. Para a Absortividade Molar os resultados obtidos para todas as amostras não foram realistas, não sendo um bom método para quantificar proteínas. Relativamente ao ensaio preliminar do FT-IR o espectro IV obtido apresentou muito ruído, não tendo uma resposta linear e por isso, não é um método que possa ser utilizado para doseamento de proteínas.

Após um balanço final, não se identificou um método que seja adequado para padrão universal para doseamento de proteínas, não tendo sido alcançado o objetivo inicial do trabalho. Contudo, considerou-se o método do Biureto a melhor metodologia para quantificar proteínas, embora o método de Kjeldahl tivesse apresentado resultados mais próximos teórico. Pelo facto deste último ser um método bastante demorado e com libertação de vapores ácidos que se tornam prejudiciais à saúde humana, torna-se pouco prático para uma utilização em rotina.

Palavras-Chave: Quantificação de proteínas; Método padrão universal; Imunoglobulina; BSA; Validação de métodos.

Abstract

Since there is no standard dosing method for the quantification of human Immunoglobulin, the main goal of this work was to perform a comparison study of several protein dosing methods to assess if any of them is adequate as a standard dosing method. This study was performed in the laboratory of Quality Control and Official Batch Release for Plasma Derived Pharmaceuticals at Infarmed.

Protein quantification was performed using Kjeldahl, Biuret, Lowry and Molar Absorptivity methods. A preliminary assessment of the Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy was also performed. Human Intravenous Immunoglobulin (IVIG), an antibody produced from human plasma was used as a standard Immunoglobulin. Bovine Serum Albumin (BSA) NIST (National Institute of Standards & Technology) was used as a reference protein solution since it is a Standard Reference Material (SRM).

The Kjeldahl method was validated, evaluating specific parameters such as accuracy and precision (repeatability and intermediate precision). For the other methods specific criteria of assay acceptance were verified.

Regarding the results obtained with the Kjeldahl method, the values were similar to the theoretical values. For the Biuret, acceptable results were obtained only for Immunoglobulin. For the Lowry method it was possible to obtain satisfactory results for the Albumin solutions although for Immunoglobulin the final results were higher than those reported in the manufacturer specifications. For Molar Absorptivity, the results were not realistic and therefore this is not an appropriate method to quantify proteins. For FT-IR the IR spectrum contained too much noise and there was no linear response, thus this is not a satisfactory method for protein dosing.

Although the goal of this work was not achieved, the Biuret method was considered the best method for protein quantification. Although the results obtained with the Kjeldahl method were closer to the theoretical values, this method takes a long time to perform and acid vapours are generated which constitutes a potential hazard. For this reasons it is not an adequate method for routine analysis.

Keywords: Protein quantification; Standard dosing method; Immunoglobulin; BSA; Methods' validation.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Porto, 29 de setembro de 2017

Rita Machado da Cruz Azevedo

(Rita Machado da Cruz Azevedo)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Instituição	2
1.3	Contributos do Trabalho.....	3
1.4	Organização da Tese	4
2	Contexto e Estado da Arte	5
2.1	Soluções Concentradas de Proteínas Terapêuticas.....	5
2.1.1	Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG)	5
2.1.2	Albumina de Soro Bovino (BSA)	7
2.2	Métodos de Doseamento de Proteína	7
2.2.1	Método de Kjeldahl	7
2.2.2	Método do Biureto	9
2.2.3	Método de Lowry	10
2.2.4	Absortividade Molar	12
2.2.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	13
2.3	Validação de Métodos	19
3	Materiais e Métodos	20
3.1	Método de Kjeldahl	20
3.1.1	Preparação de Soluções.....	20
3.1.2	Técnica.....	21
3.2	Método do Biureto	21
3.2.1	Preparação de Soluções.....	21
3.2.2	Técnica.....	22
3.3	Método de Lowry.....	23
3.3.1	Preparação de Soluções.....	23
3.3.2	Técnica.....	24
3.4	Absortividade Molar	25

3.4.1	Preparação de Soluções.....	25
3.4.2	Técnica.....	25
3.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	26
3.5.1	Preparação das Soluções.....	26
3.5.2	Técnica.....	26
4	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Método de Kjeldahl.....	27
4.2	Método do Biureto.....	29
4.3	Método de Lowry.....	33
4.4	Absortividade Molar.....	35
4.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	36
5	Conclusões.....	41
6	Avaliação do trabalho realizado.....	43
6.1	Objetivos Realizados.....	43
6.2	Outros Trabalhos Realizados.....	43
6.3	Limitações e Trabalho Futuro.....	43
6.4	Apreciação Final.....	44
7	Referências.....	45
8	Anexo 1 - Materiais e Métodos.....	49
8.1	Preparação de Soluções.....	49
9	Anexo 2 - Resultados e Discussão.....	52
9.1	Método de Kjeldahl.....	52
9.2	Método do Biureto.....	54
9.3	Método de Lowry.....	67

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama da estrutura de IgG. Retirado de (Mieloma Múltiplo, 2016).....	6
Figura 2 - Esquema do equipamento Kjeldahl. Adaptado de (PanReac AppliChem ITW Reagents, 2012).	9
Figura 3 - Interação do íon Cu^{2+} no método do Biureto. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010). ...	10
Figura 4 - Reação esquemática do método de Lowry. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010).....	11
Figura 5 - Absorção de luz UV para a Absortividade Molar. Adaptado de (Lucena, 2011).....	12
Figura 6 - Funcionamento do espectrómetro IV. Adaptado de (Thermo Nicolet, 2001).	14
Figura 7 - <i>Layout</i> do espectrómetro FT-IR. Adaptado de (Thermo Nicolet, 2001).	15
Figura 8 - Vibrações das bandas Amida I e Amida II no espectro IV. Adaptado de (EMD Millipore, 2012).	16
Figura 9 - Método do biureto: (a) soluções preparadas; (b) espectrofotômetro UV/VIS utilizado.	23
Figura 10 - Procedimento do método de Lowry. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010).	24
Figura 11 - Cartões de filtro utilizados na espectroscopia FT-IR: (a) anel hidrofóbico; (b) ponto hidrofílico.	26
Figura 12 - Comparação entre MRI-d e BSA NIST obtido no <i>software</i> CombiStats™.	30
Figura 13 - Gráfico obtido por FT-IR para várias diluições de Octagam 10 %.	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação das vantagens e limitações teóricas dos métodos estudados.	18
Tabela 2 - Volume de amostra líquida a ser usado por ensaio. Retirado de (Infarmed, 2014).	20
Tabela 3 - Valores médios obtidos para os ensaios de validação, para o método de Kjeldahl.	27
Tabela 4 - Valores médios obtidos para cada amostra, para o método do Kjeldahl.	28
Tabela 5 - Valores médios obtidos para cada lote de amostra, para o método do Biureto.	31
Tabela 6 - Valores médios obtidos para cada amostra, para o método de Lowry.	33
Tabela 7 - Valores obtidos para a substância padrão, para a Absortividade Molar.	35
Tabela 8 - Resultados obtidos para cada amostra, para a Absortividade Molar.	36
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos para o método de Kjeldahl e para o método do Biureto.	38
Tabela 10 - Comparação das vantagens e limitações da literatura e práticas.	39
Tabela 11 - Diluições realizadas para as soluções de BSA NIST, para o método o Biureto.	49
Tabela 12 - Diluições prévias realizadas para cada amostra, para o método do Biureto.	50
Tabela 13 - Diluições realizadas para as soluções de BSA, para o método de Lowry.	50
Tabela 14 - Diluições prévias realizadas para cada amostra, para o método de Lowry.	51
Tabela 15 - Diluições realizadas para cada amostra, para o método de Lowry.	51
Tabela 16 - Diluições realizadas para o padrão e para cada amostra, para a Absortividade Molar. .	51
Tabela 17 - Resultados obtidos para os ensaios de validação, para o método de Kjeldahl.	52
Tabela 18 - Resultados obtidos para as amostras analisadas, para o método de Kjeldahl.	53
Tabela 19 - Valores obtidos para a reta de calibração de MRI-d e para a amostra de BSA NIST, para o método do Biureto.	55
Tabela 20 - Valores obtidos para a reta de calibração de BSA e para a amostra de MRI-d, para o método do Biureto.	56
Tabela 21 - Resultados obtidos para Albumina Humana 20 %, para o método do Biureto.	57
Tabela 22 - Resultados obtidos para Alburnorm 4 %, para o método do Biureto.	58
Tabela 23 - Resultados obtidos para Alburnorm 5 %, para o método do Biureto.	59
Tabela 24 - Resultados obtidos para Alburnorm 20 %, para o método do Biureto.	60
Tabela 25 - Resultados obtidos para Alburnorm 25 %, para o método do Biureto.	61
Tabela 26 - Resultados obtidos para Flebogamma DIF 5 %, para o método do Biureto.	62
Tabela 27 - Resultados obtidos para Flebogamma DIF 10 %, para o método do Biureto.	63

Tabela 28 - Resultados obtidos para Gammanorm, para o método do Biureto.	64
Tabela 29 - Resultados obtidos para Octagam 5 %, para o método do Biureto.	65
Tabela 30 - Resultados obtidos para Octagam 10 %, para o método do Biureto.	66
Tabela 31 - Resultados obtidos para Rhesonativ, para o método do Biureto.	67
Tabela 32 - Resultados obtidos para Albumina Humana 20 %, para o método de Lowry.	68
Tabela 33 - Resultados obtidos para Gammanorm, para o método de Lowry.	68
Tabela 34 - Resultados obtidos para Octagam 5 %, para o método de Lowry.	69
Tabela 35 - Resultados obtidos para Octagam 10 %, para o método de Lowry.	70

Notação e Glossário

A	Absorvância	
A_S	Absorvância corrigida da solução padrão	
A_U	Absorvância corrigida da solução problema	
c	Concentração molar	M
C_S	Concentração em proteína da solução padrão	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
C_U	Concentração em proteína da solução problema	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
CV	Coeficiente de variação	%
E	Energia da luz	J
h	Constante de <i>Planck</i>	J·s
L	Comprimento	cm
n	Número de ensaios	
P	Radiação de energia transmitida	
P_0	Radiação de energia incidente	
s	Desvio padrão	
T	Transmitância	
t_{cal}	Tempo calculado	s
t_{tab}	Tempo tabelado	s
v	Velocidade da luz	$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
x_i	Valor do ensaio	
\bar{x}	Valor médio dos ensaios	
W	Número de onda	cm^{-1}

Letras gregas

ε	Absortividade molar	$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
λ	Comprimento de onda	cm

Lista de Siglas

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DCQ	Direção de Comprovação da Qualidade

EDQM	Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos (<i>European Directorate for the Quality of Medicines</i>)
EN	Norma Europeia
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform InfraRed</i>)
HCP	Proteína de Célula Hospedeira (<i>Host Cell Protein</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
IEC	Comissão Eletrônica Internacional (<i>International Electrotechnical Commission</i>)
IgG	Imunoglobulina G
ISO	Organização Internacional de Normalização (<i>International Organization for Standardization</i>)
IV	Infravermelho
IVIG	Imunoglobulina Intravenosa (<i>Intravenous Immunoglobulin</i>)
LBM	Laboratório de Biologia e Microbiologia
LQTF	Laboratório de Química e Tecnologia Farmacêuticas
MRI-d	Material de Referência Interno para doseamento
NIST	Instituto Internacional de Normas e Tecnologias (<i>National Institute of Standards & Technology</i>)
OMCL	Laboratório Oficial de Controlo dos Medicamentos (<i>Official Medicines Control Laboratories</i>)
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEG	Procedimento Específico de Gestão
SI	Sistema Internacional
SRM	Material Padrão de Referência (<i>Standard Reference Material</i>)

UV Ultravioleta

VIH Vírus da Imunodeficiência Humana

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Uma vez que ainda não existe um método padrão universal para doseamento em Imunoglobulinas humanas, o presente trabalho tem como objetivo a realização de um estudo comparativo de vários métodos de doseamento, avaliando qual o método mais adequado para esse fim, em ambiente de Controlo de Qualidade e de Libertação Oficial de Lote de Medicamentos derivados do plasma humano.

Cada proteína representa desafios individuais dependendo da sua estrutura e modo de ação. Assim, é necessário quantificar as proteínas, utilizando um método que deve ser executado de acordo com uma norma que permita uma aprovação das autoridades reguladoras e que se torna um requisito básico ao longo do desenvolvimento de fármacos (Aschermann et al., 2008). Por outro lado, a quantificação de proteínas também é muito importante e comum para determinadas aplicações, nomeadamente em investigação bioquímica e em práticas de rotina laboratorial clínica (Okutucu et al., 2007).

Quando é necessário determinar a concentração de proteína total numa amostra, o principal aspeto a considerar passa pela seleção do método de quantificação (Thermo Scientific, 2010), uma vez que a maioria dos métodos utilizados dependem da composição proteica e por isso, os resultados são influenciados especialmente pelas técnicas e padrões utilizados (Okutucu et al., 2007).

Deste modo, administrar uma dose exata e reprodutível de fármaco a um paciente é crítico para aumentar a segurança do medicamento e garantir a sua eficácia. Devido a estes requisitos, atualmente nenhum método único de quantificação consegue determinar a verdadeira concentração de proteína para todas as amostras, em todos os tipos de solução tampão (Aschermann et al., 2008).

No sentido de escolher o método mais adequado, existem três aspetos principais com os quais é necessário ter especial consideração: onde será utilizado o método no desenvolvimento de fármacos; que características serão quantificadas; quais são as propriedades únicas da proteína de interesse (Aschermann et al., 2008).

Depois de escolher e estabelecer um método de quantificação de proteínas para a aplicação específica requerida, o passo seguinte é validar esse método (Aschermann et al., 2008). A validação de métodos analíticos consiste na confirmação, através de exames e provas de evidência objetiva, de que são satisfeitos os requisitos específicos referentes a uma dada utilização pretendida (Instituto Português da Qualidade, 2005).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), “métodos analíticos sensíveis e métodos seletivos, durante a evolução quantitativa de fármacos e dos seus metabolitos (analitos), são críticos para o sucesso de estudos pré-clínicos e/ou biofarmacêuticos e estudos farmacológicos clínicos” (Bartolucci et al., 2016). Para isso, existem parâmetros de validação *International Conference on Harmonisation* (ICH): **exatidão** (concordância entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceite como valor de referência); **precisão** (concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo método analítico várias vezes, em condições definidas, em múltiplas tomas da mesma mostra homogénea); **repetibilidade** (expressa a precisão obtida sob as mesmas condições de trabalho durante um curto intervalo de tempo); **precisão intermédia** (expressa variações dentro de um determinado laboratório); **especificidade** (capacidade de avaliar inequivocamente um analito na presença de outros componentes); **limite de deteção** (menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato); **limite de quantificação** (menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com exatidão e precisão adequadas); **linearidade** (capacidade do método analítico para obter resultados de testes diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra); **gama de trabalho** (intervalo entre as concentrações mais altas e mais baixas de analito numa amostra) (Infarmed, 2016).

Deste modo, para comparação dos diferentes métodos, realizaram-se o método de Kjeldahl, o método do Biureto, o método de Lowry e a Absortividade Molar, tendo-se avaliado as vantagens e limitações de cada um, utilizando preparações de Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG) e não intravenosa. Para cada um dos métodos, estudaram-se os parâmetros de avaliação adequados, uma vez que cada uma das metodologias apresenta parâmetros específicos de validação, não sendo possível avaliar todos os parâmetros mencionados anteriormente.

Por fim, realizou-se uma avaliação preliminar da utilização de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), no sentido de estudar a possibilidade do uso deste método em substituição dos restantes, uma vez que esta metodologia é utilizada para identificar um composto ou para conhecer a composição de uma amostra.

1.2 Apresentação da Instituição

O estudo foi desenvolvido nas instalações do INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., no Laboratório de Biologia e Microbiologia (LBM) da Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ). O Infarmed é um instituto público integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa, financeira e

património próprio (Infarmed, 2015). O Infarmed prossegue as atribuições do Ministério da Saúde, sob superintendência e tutela do respetivo ministro (Infarmed, 2016).

O Infarmed tem por missão regular e supervisionar os setores dos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos, segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública e garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos, dispositivos médicos ou produtos cosméticos, de qualidade, eficazes e seguros (Infarmed, 2015).

A DCQ tem como competências participar no sistema de garantia da qualidade dos medicamentos, proceder à libertação oficial de lotes de medicamentos de origem biológica, apoiar a avaliação da qualidade e segurança farmacotológica, participar em estudos de colaboração com outras entidades oficiais, assegurar e promover atividades de investigação científica no âmbito da qualidade e segurança dos medicamentos e produtos de saúde, realizar estudos para entidades públicas e privadas, assegurar a elaboração de normas e orientações, coordenar atividades de investigação e desenvolvimento, colaborar na prestação de assessoria científica, assegurar a participação na Rede Europeia dos Laboratórios Oficiais de Controlo da Qualidade dos Medicamentos e assegurar a representação nacional e internacional do Infarmed (Infarmed, 2016).

A DCQ é composta pelas subunidades LBM e Laboratório de Química e Tecnologia Farmacêuticas (LQTF). O LBM tem como competências comprovar a qualidade de medicamentos biológicos e biotecnológicos (nomeadamente hemoderivados), realizar ensaios de aferição biológica, métodos biológicos e parâmetros analíticos de natureza química e físico-química, proceder à avaliação documental de vacinas, medicamentos hemoderivados e medicamentos contendo hemoderivados como excipiente, realizar ensaios de controlo da qualidade microbiológica em medicamentos e produtos de saúde e colaborar no desenvolvimento de metodologias de referência (Infarmed, 2016).

1.3 Contributos do Trabalho

O trabalho teve como objetivo a avaliação de qual o método analítico mais adequado ao doseamento da quantidade total de proteína em medicamentos hemoderivados e de um padrão de trabalho correspondente. Deste modo, o trabalho desenvolvido permitiu uma comparação de diferentes métodos de quantificação, uma vez que não existe registo de estratégia semelhante de comparação de métodos. As técnicas são bem estudadas por outros investigadores, em que a diferença se baseia na realização da comparação das metodologias, sendo, portanto, a base principal do meu estudo.

1.4 Organização da Tese

No presente trabalho, inicialmente apresentou-se uma breve descrição da Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG) e do padrão utilizado, a Albumina de Soro Bovino (BSA), assim como uma descrição detalhada dos métodos mais importantes para quantificação de proteínas, referindo algumas das suas aplicações, bem como vantagens e desvantagens para cada um. Deste modo, realizou-se ainda uma avaliação preliminar da possibilidade de utilizar espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) em rotina, para quantificar proteínas.

De seguida, realizou-se uma listagem dos materiais e métodos utilizados, nomeadamente as soluções preparadas necessárias ao desenvolvimento do trabalho e as técnicas utilizadas. Após a realização das diferentes metodologias, avaliou-se os resultados obtidos, seguida da sua discussão aprofundada e comparação dos métodos estudados.

Por fim, enumerou-se as conclusões retiradas do trabalho, assim como um balanço das contribuições do mesmo para projetos futuros.

2 Contexto e Estado da Arte

Os métodos de ensaio que serviram de base ao presente trabalho foram enquadrados em atividades no âmbito da Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, que especifica os requisitos gerais de competência para realizar ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem (Instituto Português da Qualidade, 2005).

2.1 Soluções Concentradas de Proteínas Terapêuticas

2.1.1 Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG)

A Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIG) é um anticorpo humano presente no sangue utilizado para administração intravenosa. Deste modo, a IVIG é utilizada para tratamentos em adultos, crianças e adolescentes que não tenham anticorpos suficientes, havendo uma terapia de substituição, ou em tratamentos de adultos, crianças e adolescentes com determinadas doenças inflamatórias, atuando como modulador do sistema imune (Infarmed, 2013).

A IVIG, produzida através de plasma humano, é o componente do plasma mais usado a nível mundial, sendo administrada em pacientes com hipogamaglobulinemia¹ e outras imunodeficiências primárias como terapia de substituição. As imunodeficiências secundárias causadas por doenças ou terapias têm aumentado, tornando-se num campo de aplicação (Bertolini et al., 2013).

As Imunoglobulinas (IgG) são usadas como agentes terapêuticos na forma de IgG policlonal ou como soro híper imune. Segundo a Academia Americana de Neurologia, os agentes da Imunoglobulina podem reduzir os sintomas da doença de *Alzheimer* (Gopinath et al., 2015). O processo de fabrico de IVIG inicia-se com a colheita e teste de uma dádiva de plasma, seguido de processos muito extensivos de separação e purificação de soluções de plasma com etanol e de processos de cromatografia (Gopinath et al., 2015). Na **Figura 1** esquematiza-se o diagrama da estrutura de IgG.

¹ A hipogamaglobulinemia é uma alteração imunohematológica que se caracteriza por baixos níveis séricos de anticorpos.

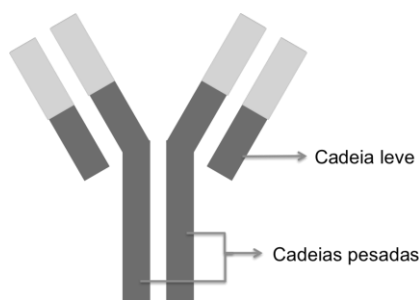


Figura 1 - Diagrama da estrutura de IgG. Retirado de (Mieloma Múltiplo, 2016).

A potencialidade de utilização do produto IVIG está diretamente ligada com a concentração de IgG no produto. A viscosidade do sangue, após uma infusão de IVIG, aumenta a proporcionalidade da concentração de IgG (diretamente proporcional ao conteúdo proteico total) no uso de preparações. Alguns autores afirmam que mudanças na viscosidade que ocorrem após uma terapia de IVIG podem prejudicar o fluxo sanguíneo e aumentar o risco de enfarte do miocárdio ou de acidente vascular cerebral em pacientes com risco de problemas cardiovasculares e tromboembólicos, representando, por isso, um estado pró-trombótico (Gopinath et al., 2015).

Deste modo, um aumento de viscosidade do plasma ou uma maior concentração de proteína pode representar um risco adicional em doentes idosos e em doentes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), com efeitos como a hipergamaglobulinemia² de lesão renal aguda que recebem grande quantidade de IVIG (Gopinath et al., 2015).

O aumento da viscosidade do sangue pode também resultar num aumento da agregação de glóbulos vermelhos, mediada por um nível mais elevado de imunoglobulina e por uma alteração nas propriedades dos glóbulos vermelhos. Assim, uma concentração de proteína mais elevada do que o valor recomendado pode contribuir para acontecimentos adversos significativos, tais como complicações renais ou episódios tromboembólicos. Por outro lado, uma concentração de proteína mais baixa do que o valor recomendado resultará numa terapia ineficaz – dose sub-terapêutica (Gopinath et al., 2015). Assim, é essencial a determinação do teor de proteína total e deste modo, obter concentrações séricas que não sejam sub-terapêuticas nem iatrogénicas.

² A hipergamaglobulinemia é uma alteração imunohematológica que se caracteriza por altos níveis séricos de anticorpos.

2.1.2 Albumina de Soro Bovino (BSA)

A Albumina de Soro Bovino (BSA) é uma proteína globular tipicamente usada em numerosas aplicações bioquímicas, devido à sua estabilidade e à sua falta de interferência com reações biológicas (Gelamo et al., 2002). A BSA é uma proteína plasmática que contribui significativamente em funções fisiológicas, tendo um papel muito importante no transporte, distribuição e metabolismo de muitos ligandos exógenos (ácidos gordos, aminoácidos, metais e fármacos) (Barik et al., 2003).

A BSA é habitualmente usada em protocolos de culturas de células, particularmente quando é necessária uma suplementação proteica e outro componente do soro é indesejado (Gülseren et al., 2007). A estabilidade da solução de BSA é excelente, especialmente se as soluções forem armazenadas como alíquotas congeladas. A albumina é frequentemente usada como estabilizador de outras proteínas solubilizadas (Santos et al., 2003).

A BSA é o padrão de albumina mais confiável para medições de determinação de proteína total (Gelamo et al., 2002), sendo o mais universal devido ao seu baixo custo, alta pureza e disponibilidade imediata (Wilson & Walker, 2000). Assim, este foi o padrão escolhido para o desenvolvimento do estudo e por ser o único padrão de proteína rastreável ao Sistema Internacional (SI) de medidas.

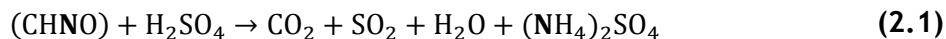
O Material Padrão de Referência (SRM) destina-se, principalmente, a ser utilizado como padrão em procedimentos de análises clínicas de proteína total de soro, na evolução crítica de padrões utilizados nestes procedimentos e como padrão de referência para ensaios de proteína total por métodos colorimétricos. O SRM é uma solução de concentração e pureza conhecidas (National Institute of Standards & Technology, 2016).

2.2 Métodos de Doseamento de Proteína

2.2.1 Método de Kjeldahl

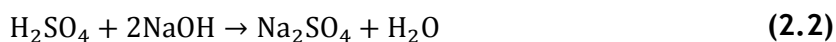
O método de Kjeldahl permite, através do doseamento de azoto, a quantificação de proteínas totais. O resultado do doseamento das proteínas pode ser afetado pela presença de outras substâncias azotadas na amostra. O método pode agrupar-se em três etapas distintas (European Pharmacopoeia 9.0).

Na primeira etapa, correspondente à **digestão** (mineralização), há decomposição do azoto por ácido sulfúrico concentrado, originando uma solução de sulfato de amónio. Neste passo deve ser utilizado um catalisador, de modo a acelerar a reação e completar a dissolução e oxidação (Chromy et al., 2015).

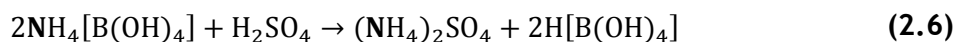
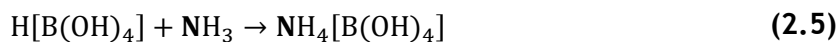


Nesta etapa, a amostra orgânica atinge o ponto de ebulição numa mistura de ácido sulfúrico concentrado, com o objetivo de quebrar as ligações N nessa amostra e converter o azoto em amónio (Chromy et al., 2015).

A segunda etapa corresponde à **neutralização e destilação**, onde, inicialmente, há um excesso de base (solução de hidróxido de sódio) que transforma a mistura da mineralização ácida numa solução fortemente alcalina, surgindo a conversão dos sais de amónio (NH_4) em amónia (NH_3). De seguida, ocorre uma destilação através de introdução de vapor de água na amostra, sendo destilada juntamente com a amónia, ocorrendo condensação e, seguidamente, formação de uma solução de ácido bórico (Infarmed, 2014).



Por último, existe a etapa da **titulação**, onde há uma titulação com ácido sulfúrico aferido (0,1 M; 0,2 N), de modo a quantificar a amónia presente na solução de recolha (Infarmed, 2014).



Na **Figura 2** ilustra-se o equipamento Kjeldahl utilizado no presente trabalho.

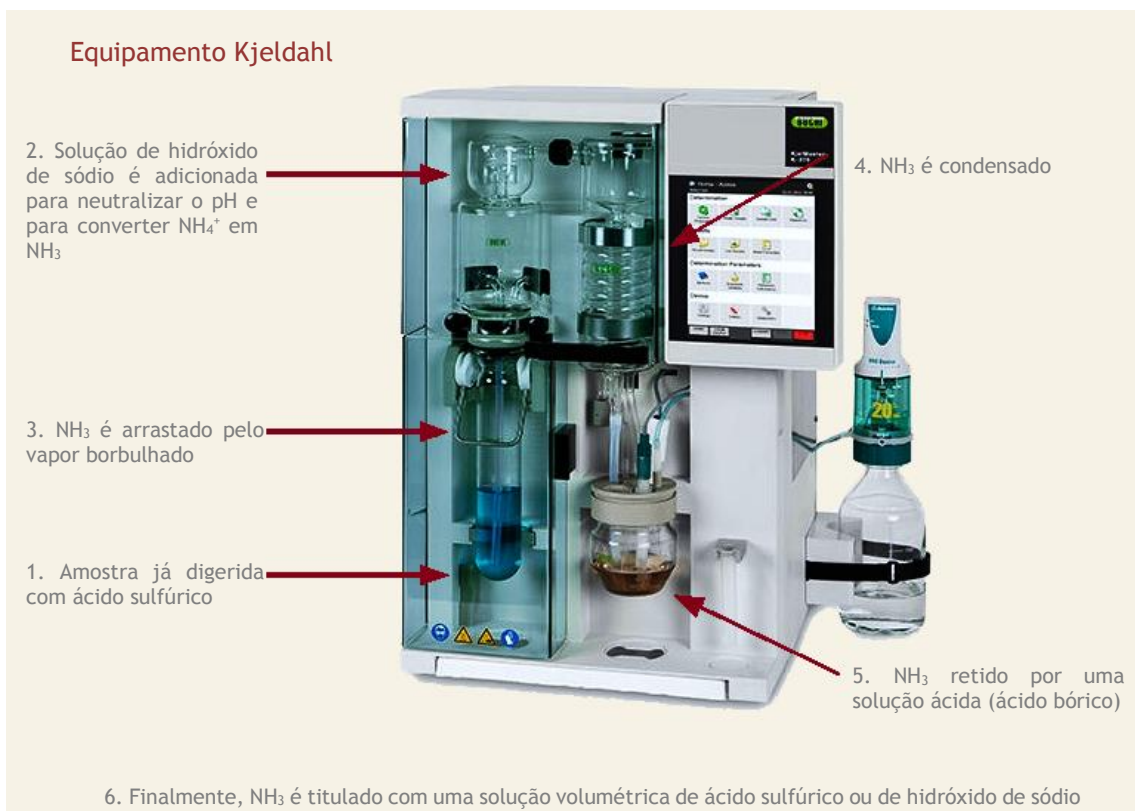


Figura 2 - Esquema do equipamento Kjeldahl. Adaptado de (PanReac AppliChem ITW Reagents, 2012).

O método de Kjeldahl apresenta algumas vantagens, como o facto de ser um método padrão de determinação do conteúdo de azoto numa solução, ser universal, ter alta precisão e ser reprodutível (Kamizake et al., 2003), bem como ser um método relativamente simples e não ser caro (Muñoz-Huerta et al., 2013).

Como desvantagens, esta metodologia não fornece uma medição da verdadeira proteína quando se quantifica soluções que contenham azoto como excipiente, diferentes proteínas necessitam de diferentes fatores de correção (têm diferentes sequências de aminoácidos) (Kamizake et al., 2003), o uso de ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas pode representar perigo, podendo ser prejudicial para o técnico e é um método bastante demorado (Muñoz-Huerta et al., 2013).

2.2.2 Método do Biureto

O método do Biureto permite determinar a concentração de proteínas totais, baseando-se na interação do ião cúprico (Cu^{2+}), presente no reagente de Biureto, em meio alcalino, com as proteínas, dando origem a um produto que apresenta absorvância a 545 nm (Farmacopeia Portuguesa 9.0). A reação que ocorre muda a cor da solução de azul para roxo (Chutipongtanate et al., 2012). O método do Biureto permite obter um desvio mínimo entre

amostras equivalentes de albumina e de IgG (European Pharmacopoeia 9.0). Na **Figura 3** apresenta-se a interação do íon cúprico com o reagente de Biureto.

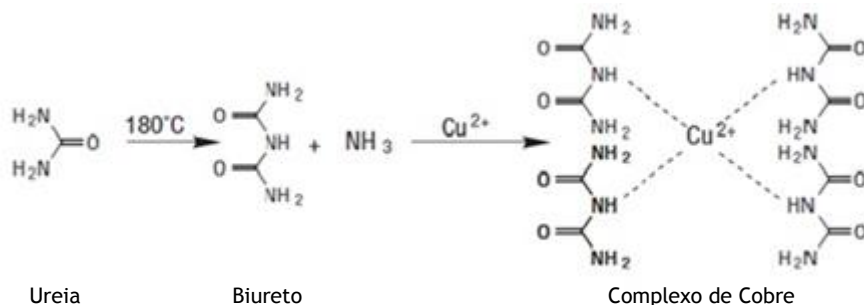


Figura 3 - Interação do íon Cu^{2+} no método do Biureto. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010).

O método do Biureto, apesar de utilizar reagentes de baixo custo, ser rápido e não apresentar grande variação de absorvância para diferentes proteínas, não é muito sensível, sendo, portanto, uma desvantagem relativamente a outros métodos igualmente conhecidos. Por esse motivo, este método tem vindo a ser substituído por outros mais sensíveis (Okutucu et al., 2007).

2.2.3 Método de Lowry

O método de Lowry é utilizado para a quantificação de proteína total em medicamentos e consiste na propriedade que as proteínas possuem de reduzir ácidos fosfomolibdotúngsticos, contidos no reagente Folin-Ciocalteu. O reagente utilizado reage, maioritariamente, com os resíduos de tirosina da proteína, provocando o desenvolvimento de uma coloração (European Pharmacopoeia 9.0). Este método é simples, sensível e preciso, sendo um procedimento bastante citado em investigação para a determinação quantitativa de proteínas (Upetri et al., 2012), no entanto a sua utilização tem vindo a diminuir ao longo dos anos (Okutucu et al., 2007).

Esta metodologia tem como princípio a similaridade com o método do Biureto, mas o método de Lowry inclui o reagente Folin-Ciocalteu na reação para aumentar a sensibilidade da reação do Biureto (Chutipongtanate et al., 2012), seguida de deteção por espectrofotometria (Infarmed, 2011).

Este método de quantificação baseia-se na interação da proteína com o sulfato e o tartarato de cobre, em meio alcalino, originando um complexo proteína-cobre que reduz o reagente de Folin-Ciocalteu num produto de cor azul, solúvel em água, detetado por espectrofotometria a 750 nm (Infarmed, 2011). A reflexão da contribuição dos aminoácidos (tirosina e triptofano) no desenvolvimento da cor é o maior problema deste método e por

isso, a sua utilização tem sido recentemente diminuída (Okutucu et al., 2007). Na **Figura 4** apresenta-se a reação que ocorre no método de Lowry.

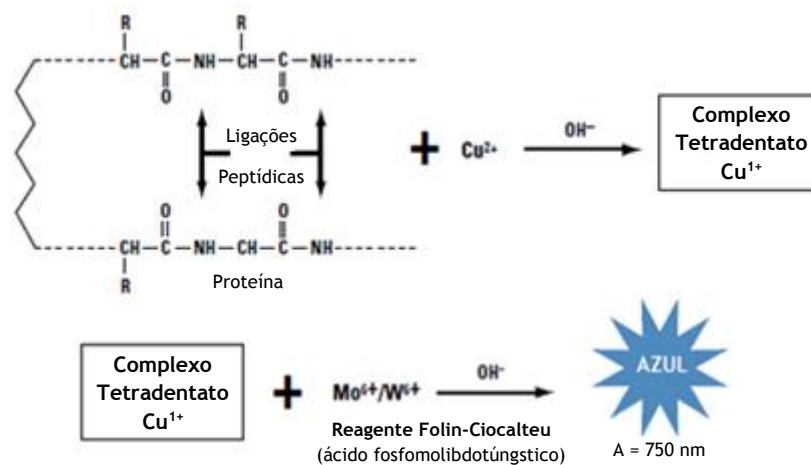


Figura 4 - Reação esquemática do método de Lowry. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010).

O método de Lowry apresenta uma alta sensibilidade, sendo, por isso, muito utilizado na determinação da concentração de proteínas totais em diferentes meios (Waterborg, 2002).

Uma vez que o método de Lowry é sensível a substâncias interferentes, é possível recorrer a um tratamento que produza a precipitação das proteínas da amostra, sendo que a maioria destas substâncias reduz a intensidade da coloração obtida, existindo, ainda, alguns detergentes que a aumenta ligeiramente (European Pharmacopoeia 9.0).

Neste método, a proteína a dosear e a proteína total são as mesmas, isto porque a intensidade da coloração pode variar consoante a espécie proteica analisada (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

Por outro lado, é possível minimizar o efeito das substâncias interferentes através de uma diluição, desde que se mantenha suficientemente alto o teor proteico a dosear, de modo a permitir uma determinação exata (European Pharmacopoeia 9.0). Normalmente estes interferentes provocam um aumento na absorvância do branco, uma diminuição da absorvância específica, ou a formação de algum tipo de precipitado sendo, por esse motivo, uma desvantagem deste método. Para eliminar estes interferentes, uma possível solução seria a precipitação das proteínas (Waterborg, 2002).

O método de Lowry, para além de ser a metodologia mais sensível, apresenta melhor exatidão, menor consumo de amostra mas, no entanto, apresenta suscetibilidade à maioria dos interferentes (Waterborg, 2002).

Contudo, ainda existem mais desvantagens relativamente a esta metodologia, nomeadamente o longo tempo de análise e a grande variabilidade de absorvância para diferentes proteínas. Apesar das tentativas de melhoramento desta metodologia, tem vindo a ser substituída por outros métodos (Waterborg, 2002).

2.2.4 Absortividade Molar

A Absortividade Molar baseia-se no facto de que as proteínas apresentam absorção a 280 nm, correspondente aos aminoácidos aromáticos e abaixo de 220 nm, que corresponde às ligações peptídicas (Palmqvist et al., 2000). Assim, este método fundamenta-se na absorção de luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 280 nm, devido à presença desses aminoácidos, nomeadamente a tirosina e o triptofano, podendo esta propriedade ser utilizada para dosear proteínas (Farmacopeia Portuguesa 9.0). Na **Figura 5** apresenta-se um espetro tipo com absorvância a 280 nm de luz UV.

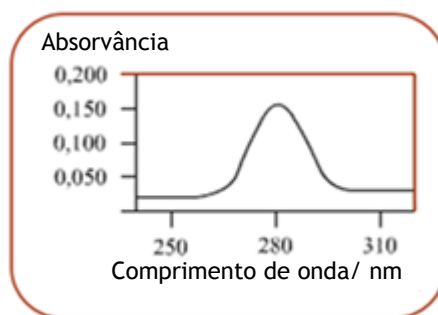


Figura 5 - Absorção de luz UV para a Absortividade Molar. Adaptado de (Lucena, 2011).

A transmitância (T) é dada pela razão da radiação de energia transmitida (P) por uma amostra pela radiação de energia incidente (P_0), presente na **Equação (2.7)** (Skoog et al., 2016).

$$T = P/P_0 \quad (2.7)$$

A absorvância (A) é definida como o logaritmo do recíproco da transmitância, referente na **Equação (2.8)** (Skoog et al., 2016).

$$A = -\log T = \log (1/T) \quad (2.8)$$

Segundo a lei de *Beer*, a absortividade molar (ϵ) é constante e a absorvância (A) é proporcional à concentração molar (c), de acordo com a **Equação (2.9)**, onde L representa o comprimento, tipicamente assumindo o valor de 1 cm (Skoog et al., 2016).

$$A = \epsilon c L \quad (2.9)$$

Em muitas aplicações envolvendo proteínas, a absorvidade molar é importante, quer para identificar frações contendo proteína, quer para estimar a concentração de uma amostra pura (Skoog et al., 2016). Este método tem sido muito utilizado nos processos de monitorização e separação de proteínas, tendo como principais vantagens ser rápido e não destruir a amostra (Palmqvist et al., 2000).

Para a maior parte das proteínas, a absorção UV deteta uma concentração inferior a 100 µg/mL (Skoog et al., 2016). Quando existem baixas concentrações, a proteína adsorvida pode provocar uma diminuição considerável do teor proteico da solução (European Pharmacopoeia 9.0). Contudo, a estimativa da concentração de proteína por absorção UV não é exata para soluções complexas de proteína, uma vez que existem proteínas com diferentes coeficientes de absorção desconhecidos (Skoog et al., 2016), ou seja, várias substâncias absorvem no UV, fazendo com que os resultados desta metodologia sejam pouco fiáveis.

O método de Absortividade Molar está sujeito a muitos interferentes, pois qualquer substância que apresente uma banda de absorção na região de leitura torna-se um potencial interferente (Palmqvist et al., 2000).

Para soluções de proteínas aquosas regularmente usadas em laboratório, a interferência com outros componentes é minimizada por medições de absorvância a 280 nm (Skoog et al., 2016).

2.2.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A determinação exata e rápida da concentração peptídica tem sido difícil por derivadas razões. Deste modo, a espectroscopia de Infravermelho (IV) é um método que permite a quantificação de péptidos de uma forma universal, rápida e exata, que não requer manipulação de amostras (Merck Millipore, 2013), ou seja, é um método fácil utilizado para identificar a presença de certos grupos funcionais numa molécula (Jaggi et al., 2006). Por outro lado, esta técnica também pode ser usada para confirmar a presença de um composto puro ou para detetar a presença de impurezas específicas (Thermo Nicolet, 2001).

A espectroscopia IV fornece um espectro que representa uma impressão digital de uma determinada amostra, com picos de absorção correspondentes à frequência das vibrações entre as ligações atómicas do material (Thermo Nicolet, 2001). A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma alternativa de tecnologia não invasiva que permite uma medição direta no fermentador ou num *bypass* sem destruição do analito. A espectroscopia FT-IR faz uso da interação entre a radiação e a matéria em diferentes números de onda (Capito et al., 2013), levando a estruturas de absorvância com

energia específica e de espectro IV específico (Capito et al., 2013), sendo, portanto, um estudo da interação da luz vermelha com a matéria (Smith, 2011). A espectroscopia FT-IR inclui o espectro de absorção, reflexão ou emissão obtido pela transformada de Fourier (Jaggi et al., 2006). Na **Figura 6** apresenta-se um esquema do funcionamento de um espectrômetro IV.

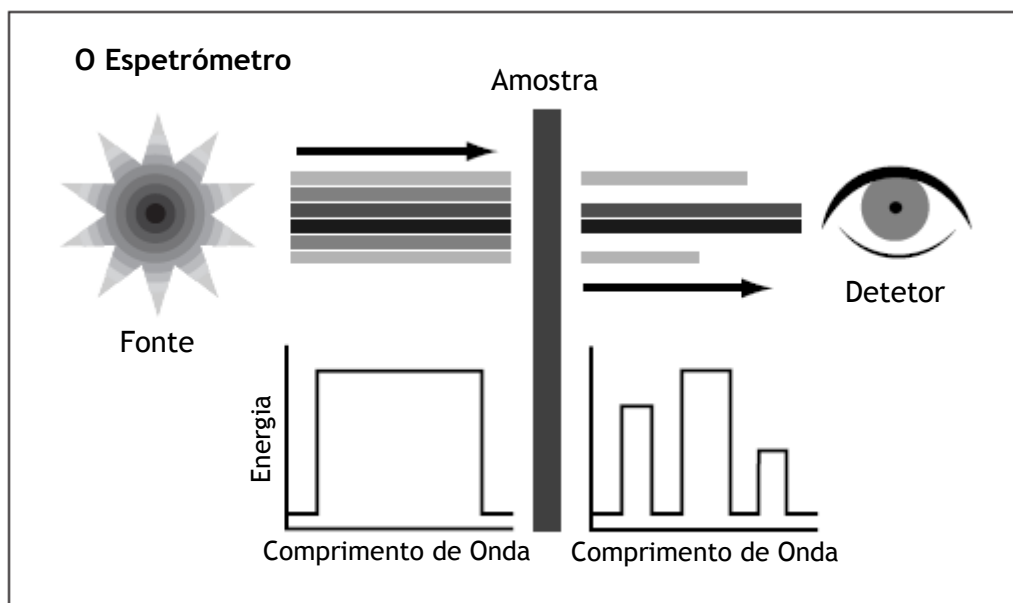


Figura 6 - Funcionamento do espectrômetro IV. Adaptado de (Thermo Nicolet, 2001).

O funcionamento do espectrômetro IV é relativamente simples, uma vez que a radiação IV passa através da amostra, sendo que uma parte é absorvida e a restante é transmitida (Thermo Nicolet, 2001). Quando a radiação IV é absorvida, interagindo com a matéria, causa a vibração das ligações químicas no material, dado que a presença destas ligações é uma condição necessária para ocorrer absorvância IV (Smith, 2011). Na **Figura 7** apresenta-se o *layout* de um espectrômetro FT-IR.

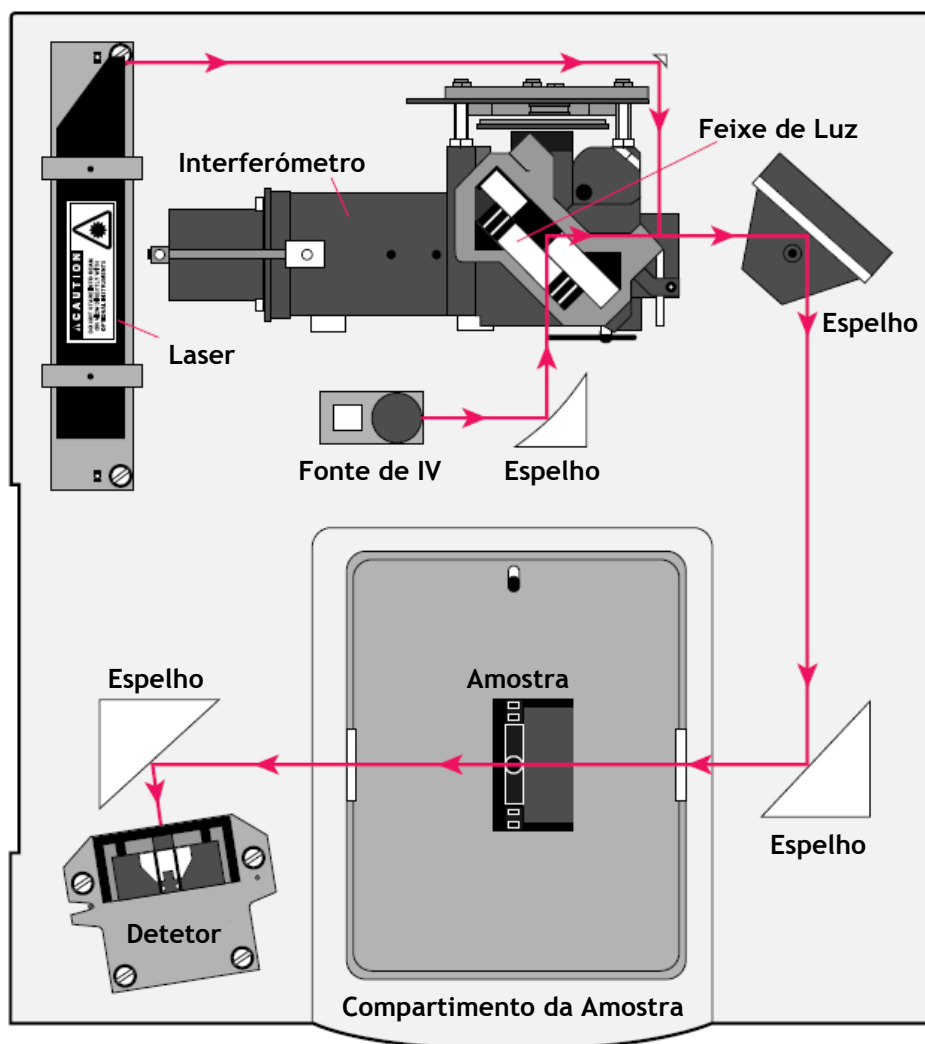


Figura 7 - Layout do espectrômetro FT-IR. Adaptado de (Thermo Nicolet, 2001).

Inicialmente, a onda de interferência é produzida no interferômetro, utilizando-se um computador para controlar este interferômetro e conseqüentemente, armazenar e tratar os dados. De seguida, o feixe de luz proveniente da fonte de IV é direcionado pelo interferômetro, onde será dividido e metade desse feixe é refletido por um espelho fixo e a outra metade por um espelho móvel. Esse feixe de luz passa através da amostra, sendo modificado pela interação com a amostra, atingindo o detetor (Griffiths et al., 2007).

A espectroscopia FT-IR é uma das técnicas potencialmente mais promissoras para monitorizar agregados, uma vez que processa um bom equilíbrio entre a sensibilidade e o tempo de análise (Capito et al., 2013).

Um espectro IV é conhecido como um gráfico da intensidade de radiação IV medida *versus* o comprimento de onda (Smith, 2011). A espectroscopia IV explora o facto de as moléculas absorverem uma frequência específica característica da sua estrutura. Um péptido é formado através de um aminoácido ligado covalentemente, por ligações peptídicas

(Merck Millipore, 2013). A radiação IV é definida como luz entre 400 e 4000 cm^{-1} , uma vez que a maioria das espectroscopias FT-IR operam nesta gama de número de onda (Smith, 2011).

Para determinar a concentração proteica e peptídica, o espectroscópio *Direct Detect*[®] utiliza a intensidade da banda Amida I que é atribuída ao alongamento da vibração C=O da ligação peptídica, com um contributo mínimo do alongamento da vibração C–N (Merck Millipore, 2013). Na **Figura 8** esquematiza-se as vibrações responsáveis pelas bandas Amida I e Amida II no espectro de IV de proteínas, onde a primeira apresenta um número de onda de aproximadamente $1600 - 1690\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao alongamento C=O, e a segunda um número de onda de aproximadamente $1480 - 1575\text{ cm}^{-1}$, que corresponde ao alongamento C–N (EMD Millipore, 2012).

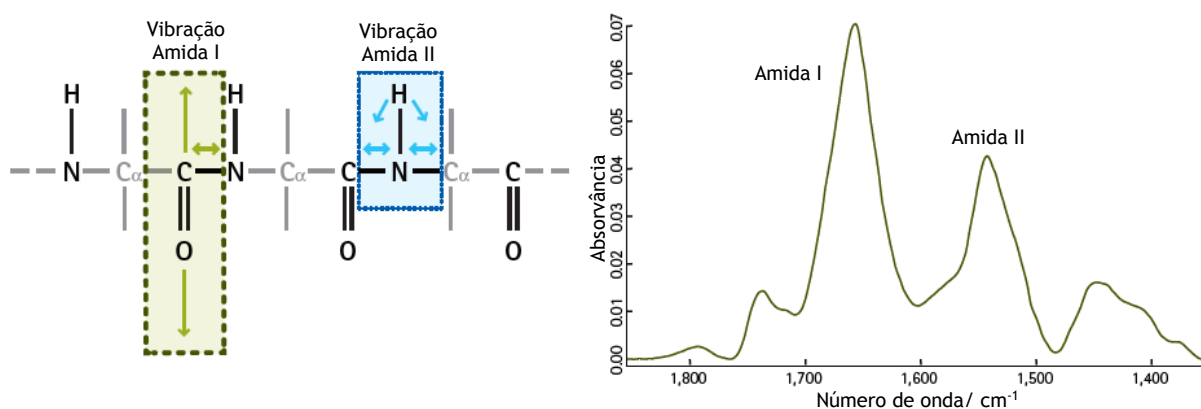


Figura 8 - Vibrações das bandas Amida I e Amida II no espectro IV. Adaptado de (EMD Millipore, 2012).

O número de onda (W), expresso em cm^{-1} , é definido como o inverso do comprimento de onda (λ), como se pode verificar na **Equação (2.10)**. De notar que o comprimento de onda (λ), expresso em cm, é a distância entre as cristas de ondas adjacentes (Smith, 2011).

$$W = 1/\lambda \quad (2.10)$$

O número de onda (W) é diretamente proporcional à sua energia, expresso pela **Equação (2.11)**, onde E representa a energia da luz (J), v a velocidade da luz ($3 \times 10^{10}\text{ cm/s}$) e h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}\text{ J.s}$) (Smith, 2011).

$$E = hvW \quad (2.11)$$

Assim, uma luz com alto número de onda tem mais energia do que uma luz com baixo número de onda. A lei de Beer, **Equação (2.9)**, é a base de todas as análises quantitativas na espectroscopia FT-IR, onde a absorvância é medida como a altura do pico do espectro FT-IR (Smith, 2011).

A espectroscopia FT-IR tem sido utilizada para quantificação de níveis de anticorpos e de impurezas de Proteína de Célula Hospedeira (HCP) em fluido de cultura celular, tendo

sido também utilizada para analisar os efeitos de armazenamento e tipo de formulação na estrutura do anticorpo (Capito et al., 2013).

As HCPs representam a maioria dos processos relacionados com o grupo de impurezas presente no sobrenadante da cultura celular, durante a produção de biofarmacêuticos. A sua remoção e quantificação durante os vários passos dos processos de *upstream* e *downstream* são requeridos como funções potencialmente antigénicas que os HCPs devem possuir. Para elucidar o potencial dos métodos de fermentação e purificação para libertação de HCP assim como efeitos de parâmetros de cultura celular na presença de HCP durante o desenvolvimento do processo, muitas análises de HCP são necessárias (Capito et al., 2013).

A aplicação da espectroscopia FT-IR para a caracterização de misturas complexas não é direta, uma vez que as culturas celulares consistem em vários componentes (vitaminas, aminoácidos, colesterol, fatores de crescimento, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e antibióticos) (Capito et al., 2013), sendo, por isso, uma limitação do método, visto que essas amostras fornecem um espectro complexo cuja interpretação é difícil devido a não se saber a que banda corresponde cada molécula na amostra (Smith, 2011).

Adicionalmente, a espectroscopia FT-IR tem sido utilizado para obter proteínas com estruturas secundárias, para identificar compostos *in situ* em diferentes composições de culturas celulares e para analisar aminoácidos únicos numa composição, numa gama milimolar. Novas estratégias envolvendo a espectroscopia FT-IR são a classificação de microrganismos, a quantificação de proteínas recombinantes em culturas de células microbianas e a determinação de anticorpos ou de títulos de antitrombina III humana em culturas de células mamíferas (Capito et al., 2013). A espectroscopia FT-IR é a ferramenta ideal para detetar grupos funcionais, mas não pode ser utilizada para elucidar a estrutura completa de uma molécula desconhecida (Smith, 2011).

A principal vantagem do FT-IR baseia-se no facto de praticamente todos os compostos apresentarem características de absorção/emissão na região do espectro IV, fazendo com que possam ser analisados quantitativa e qualitativamente (Jaggi et al., 2006). O FT-IR apresenta outras vantagens, como nomeadamente ser um método rápido (uma vez que todas as frequências são medidas simultaneamente), ser sensível, apresentar uma mecânica simples e ser calibrado internamente, sendo um método bastante utilizado quando o tempo de análise é um fator limitante (Griffiths et al., 2007). Estas vantagens tornam as medições realizadas por FT-IR extremamente exatas e reprodutíveis.

Como todos os métodos, a espectroscopia FT-IR também apresenta algumas limitações, para além das referidas anteriormente. A limitação principal deste equipamento baseia-se na impossibilidade de detetar átomos e iões monoatômicos, isto porque uma

entidade atômica única não possui ligações químicas nem movimentos vibratórios que, por sua vez, faz com que não absorva radiação IV (Smith, 2011).

Na **Tabela 1** apresenta-se um resumo da comparação das vantagens e limitações teóricas dos métodos analisados ao longo do trabalho, citadas anteriormente, visto que na ciência nenhum método é infalível nem apresenta só vantagens, havendo parâmetros incontrolláveis que poderão existir ao longo do desenvolvimento científico.

Tabela 1 - Comparação das vantagens e limitações teóricas dos métodos estudados.

Método	Vantagens	Limitações
Kjeldahl	<ul style="list-style-type: none"> - Método padrão de determinação do conteúdo de azoto numa solução - Universal - Tem alta precisão e é reprodutível - Método relativamente simples e não é caro 	<ul style="list-style-type: none"> - Não fornece uma medição da verdadeira proteína tendo azoto como excipiente - O uso de ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas pode provocar algum tipo de perigo - Método demorado
Biureto	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliza reagente de baixo custo - Rápido - Não apresenta grande variação de absorvidade para diferentes proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é muito sensível - Tem vindo a ser substituído por outros métodos mais sensíveis
Lowry	<ul style="list-style-type: none"> - Simples, sensível e preciso - Melhor exatidão e menor consumo de amostra 	<ul style="list-style-type: none"> - Suscetível a muitos interferentes - Longo tempo de análise - Grande variabilidade de absorvância para diferentes proteínas
Absortividade Molar	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido e não destrói a amostra - Utilizado para identificar frações contendo proteína, ou para estimar a concentração de uma amostra pura 	<ul style="list-style-type: none"> - Está sujeito a muitos interferentes - Várias substâncias absorvem no UV, fazendo com que os resultados sejam pouco viáveis

FT-IR	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido e sensível - Mecânica simples - Calibrado internamente - Ferramenta ideal para detetar grupos funcionais 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de detetar átomos e iões monoatômicos - Não pode ser utilizada para elucidar a estrutura completa de uma molécula desconhecida
-------	--	---

2.3 Validação de Métodos

Um dos parâmetros mais importantes do presente trabalho foca-se na validação de métodos, sendo um procedimento fulcral e obrigatório para qualquer método de modo a verificar se os requisitos específicos para esse método são satisfeitos (Instituto Português da Qualidade, 2005).

Para a validação de métodos, com base na *guideline “Validation of Analytical Procedures”*, *European Network of Official Medicines Control Laboratories*, PA/PH/OMCL (13) 82 2R, EDQM (Infarmed, 2014), que constitui uma discussão das características de validação que devem ser consideradas durante a validação de um procedimento analítico (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014), torna-se necessário verificar alguns parâmetros de validação.

Esses parâmetros baseiam-se na **exatidão**, que deve ser estabelecida na gama especificada do método analítico e avaliada com base em pelo menos 9 resultados, no mínimo em 3 níveis de concentração, em pelo menos 3 dias diferentes; e na **precisão**, mais especificamente a repetibilidade, avaliada com base em pelo menos 6 resultados de uma mesma amostra, obtidos no mesmo dia e pelo mesmo operador e devem ser realizadas, no mínimo, 9 determinações cobrindo a gama de trabalho especificada e a precisão intermédia, para estabelecer os efeitos de eventos aleatórios na precisão de um método analítico, avaliada com base em pelo menos 9 resultados de uma mesma amostra, obtidos em pelo menos 3 dias diferentes (Bartolucci et al., 2016).

3 Materiais e Métodos

No desenvolvimento do projeto, as amostras estudadas foram soluções de Albuminas e Imunoglobulinas disponíveis comercialmente e com Autorização de Introdução do Mercado (AIM) em Portugal. As Albuminas utilizadas foram a Albumina Humana 20 %, os Alburnorm 4 %, 5 %, 20 % e 25 %, e as Imunoglobulinas foram os Flebogamma® DIF 5 % e 10 %, o Gammanorm 165 mg/mL, os Octagam 5 % e 10 % e o Rhesonativ 165 mg/mL, sendo a imunoglobulina específica o antígeno D (Rhesus). De notar que todas as imunoglobulinas utilizadas correspondem a imunoglobulina G (IgG).

Para a amostra padrão, utilizou-se a Albumina de Soro Bovino (BSA) NIST (*National Institute of Standard & Technology*), uma vez que é o único padrão certificado existente.

3.1 Método de Kjeldahl

Para o método de Kjeldahl estudaram-se os Flebogamma® DIF 5 % e 10 % e os Octagam 5 % e 10 %.

3.1.1 Preparação de Soluções

Todas as amostras foram adicionadas a 18 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 95 % mínimo com 2 pastilhas de mineralização (10 g), à exceção do controlo negativo (branco) onde não se adicionou nenhuma amostra, sendo que todas as soluções foram testadas em duplicado (Infarmed, 2014).

Para preparar o padrão L-Fenilalanina, pesaram-se 0,30 g de fenilalanina, com um valor teórico de azoto de 8,47 % (Infarmed, 2014).

Para preparar as soluções problema, correspondente às soluções que se pretende analisar, calculou-se o volume de amostra a usar, utilizando a **Tabela 2** (Infarmed, 2014).

Tabela 2 - Volume de amostra líquida a ser usado por ensaio. Retirado de (Infarmed, 2014).

Concentração de Proteína	Concentração de Azoto	Volume de Amostra
< 3 %	< 0,5 %	2 mL
3 - 8 %	0,5 - 1,3 %	1 mL
> 8 %	> 1,3 %	0,5 mL

Para preparar a solução padrão, adicionaram-se 0,9 mL de Albumina de Soro Bovino (BSA) NIST (*National Institute of Standards & Technology*), ao invés de 1 mL como seria ideal, uma vez que representa a solução limitante e tratando-se de ampolas com 2,2 mL esse seria o volume máximo a utilizar por pipetagem reversa, resultando no consumo de uma ampola por ensaio.

Para preparar a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 32 %, adicionaram-se 1600 g de hidróxido de sódio a 4750 mL de água purificada, colocando o balão volumétrico em gelo e agitando até à dissolução completa. Por fim, acertou-se o volume num balão volumétrico de 5000 mL (Infarmed, 2017).

Para preparar a solução de ácido bórico (H_3BO_3) 4 %, adicionaram-se 200 g de ácido bórico a 4750 mL de água purificada e agitou-se até à dissolução completa. De seguida, ajustou-se o pH da solução para $4,65 \pm 0,2$ ($20^\circ C$) e, por fim, acertou-se o volume num balão volumétrico de 5000 mL (Infarmed, 2017).

Para preparar a solução de neutralização dos vapores ácidos, pesaram-se 300 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 10 % e perpez-se um volume de 3 L de água purificada, agitando-se até à dissolução completa. De seguida, pesaram-se 100 mg de azul de bromotimol e adicionou-se à solução de carbonato de sódio (Infarmed, 2013).

3.1.2 Técnica

Para o método de Kjeldahl utilizou-se o instrumento semi automatizado da marca BUTCHI, modelo *KjelMaster* K-375, adaptado ao doseamento do azoto por esta metodologia (European Pharmacopoeia 9.0).

3.2 Método do Biureto

Para o método do Biureto estudaram-se a Albumina Humana 20 %, os Alburnorm 4 %, 5 %, 20 % e 25 %, os Flebogamma® DIF 5 % e 10 %, o Gammanorm 165 mg/mL, os Octagam 5 % e 10 % e o Rhesonativ 165 mg/mL.

3.2.1 Preparação de Soluções

Para preparar o reagente de Biureto, inicialmente preparou-se uma solução A, onde se dissolveram 3,46 g de sulfato de cobre penta-hidratado ($CuO_4S.5H_2O$) em 10 mL de água purificada quente. De seguida, preparou-se uma solução B, onde se dissolveram 3,46 g de citrato de sódio di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) e 20,0 g de carbonato de sódio anidro

(Na_2CO_3) em 80 mL de água purificada quente. Por fim, misturaram-se as soluções e fez-se um volume de 200 mL com água purificada (Infarmed, 2013).

Preparou-se a solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % (m/v), onde se pesaram 9 g de cloreto de sódio e adicionaram-se 1000 mL de água purificada, agitando até se obter uma dissolução completa (Infarmed, 2011).

De seguida, preparou-se a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,5 M, onde se pesaram 60 g de hidróxido de sódio e se adicionou a uma quantidade de água purificada inferior a 1000 mL, agitando até se obter a dissolução completa. Por último, acertou-se o volume num balão volumétrico de 1000 mL (Infarmed, 2011).

Para preparar o branco, adicionou-se 1 mL de NaCl 0,9 % (m/v), 1 mL de NaOH e 400 μL de reagente de Biureto (Infarmed, 2013).

Para preparar a solução padrão, realizou-se uma diluição prévia 1/3 (353 μL em 647 μL de solvente) da BSA NIST em NaCl 0,9 % (m/v), recorrendo-se a uma pipetagem reversa devida à elevada viscosidade do produto, de modo a obter-se uma solução com uma concentração de 49,463 mg/mL, valor igual à concentração do Material de Referência Interno para doseamento (MRI-d) utilizado para ensaios de rotina.

Para preparar a solução problema, todas as amostras foram pré-diluídas em NaCl 0,9 % (m/v), utilizando-se pipetagem reversa, no sentido de se obter uma concentração de 25 mg/mL (Infarmed, 2013). Na **Tabela 12**, presentes em **Anexo 1 - Materiais e Métodos**, apresenta-se as diluições prévias realizadas para cada amostra.

3.2.2 Técnica

Inicialmente, realizaram-se 5 diluições diferentes de BSA NIST (através da solução pré-diluída), 3 repetições de cada, e uma diluição 1/20 para cada amostra pré-diluída, utilizando 50 μL de amostra pré-diluída + 950 μL de solvente (Infarmed, 2013). Na **Tabela 11**, presente em **Anexo 1 - Materiais e Métodos**, apresenta-se as diluições preparadas e as concentrações finais para cada solução, para a BSA NIST.

De seguida, alcalinizou-se cada solução com 1 mL de NaOH, utilizando uma pipeta de repetição (com capacidade de 10 mL) e com a mesma pipeta adicionaram-se 400 μL de reagente de Biureto, misturando-se (Infarmed, 2015).

Durante pelo menos 20 minutos, mantiveram-se as amostras a uma temperatura compreendida entre 15 °C e 25 °C (temperatura ambiente). Nos 20 minutos após a adição do reagente determinou-se a absorvância, a 545 nm, num espectrofotómetro UV/VIS da marca *Thermo Spectronic*, modelo *Helios Alpha*, das soluções padrão e da solução problema,

usando o branco (solução de cloreto de sódio 0,9 %) como líquido de compensação (Infarmed, 2015).

Na **Figura 9** apresenta-se as soluções preparadas para o método do biureto e o espectrofotômetro UV/VIS utilizado para ler as absorvâncias dessas amostras.

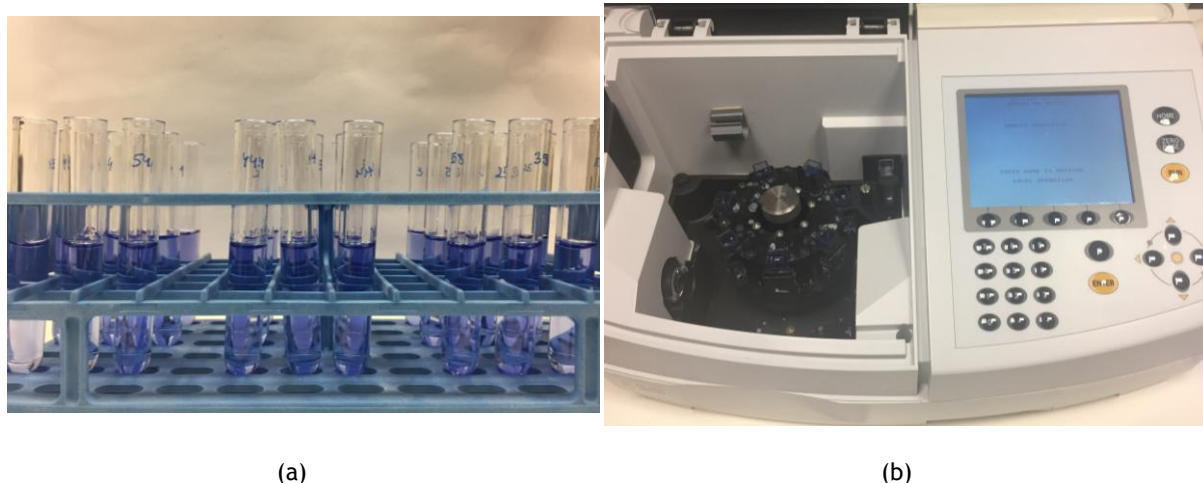


Figura 9 - Método do biureto: (a) soluções preparadas; (b) espectrofotômetro UV/VIS utilizado.

3.3 Método de Lowry

Para o método de Lowry estudaram-se a Albumina Humana 20 %, o Gammanorm e os Octagam 5 % e 10 %.

3.3.1 Preparação de Soluções

Começou por se preparar o reagente Folin-Ciocalteu (1N), realizando-se uma diluição de uma parte de água para uma parte de reagente Folin-Ciocalteu (2N). Isto significa que, para cada ensaio, se realizou uma solução com 1500 µL de reagente Folin-Ciocalteu (2N) e 1500 µL de água purificada.

Para preparar a solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % (m/v), pesaram-se 9 g de cloreto de sódio e adicionaram-se 1000 mL de água purificada, agitando até se obter uma dissolução completa (Infarmed, 2011).

Para preparar o branco, juntaram-se 0,2 mL de NaCl 0,9 % (m/v), 1 mL de reagente de Lowry modificado e 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1N) (Infarmed, 2011).

Para preparar a solução padrão, diluiu-se a BSA (1:10) em NaCl 0,9 % (m/v), sendo que a curva de calibração foi efetuada com 5 amostras, com concentrações compreendidas entre 5 µg/mL e 200 µg/mL, preparadas em triplicado (Infarmed, 2011). Na **Tabela 13**,

presente em **Anexo 1 - Materiais e Métodos**, apresenta-se as concentrações e as respectivas diluições realizadas para cada amostra da curva padrão.

Na preparação das soluções problema, todas as amostras foram pré-diluídas em NaCl 0,9 % (m/v), no sentido de se obter uma concentração contida no intervalo de concentrações da curva padrão (Infarmed, 2011). Na **Tabela 14** apresenta-se as diluições prévias realizadas para cada amostra e na **Tabela 15** as diluições realizadas de modo a obter uma concentração final de 100 µg/mL, presente em **Anexo 1 - Materiais e Métodos**.

Para este método utilizou-se o *kit* da Pierce™ *Modified Lowry Protein Assay Kit*, contendo o reagente de Lowry modificado, o reagente de Folin-Ciocalteu (2N) e a albumina sérica bovina (2 mg/mL), utilizada como substância padrão.

3.3.2 Técnica

Inicialmente, mediram-se 0,2 mL (200 µL) da diluição apropriada de padrão ou de amostra para um tubo de ensaio de 5 mL, adicionando-se, posteriormente, 1,0 mL de reagente de Lowry modificado. Misturou-se a solução obtida e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Imediatamente após, adicionaram-se 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1N), misturou-se, cobriu-se e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, leram-se as absorvâncias das soluções padrão e das amostras contra o branco num espectrofotômetro a 750 nm (Infarmed, 2011). Na **Figura 10** esquematiza-se o procedimento experimental correspondente.

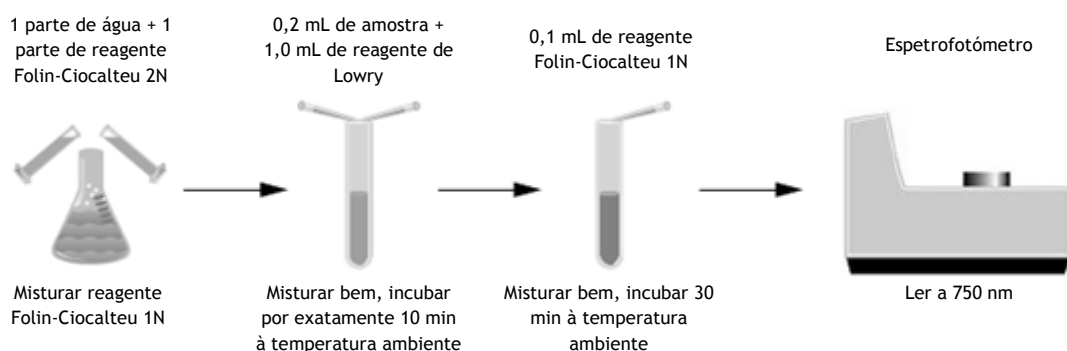


Figura 10 - Procedimento do método de Lowry. Adaptado de (Thermo Scientific, 2010).

3.4 Absortividade Molar

3.4.1 Preparação de Soluções

Para preparar a solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % (m/v), pesaram-se 9 g de cloreto de sódio e adicionaram-se 1000 mL de água purificada, agitando até se obter uma dissolução completa (Infarmed, 2011).

Para preparar as soluções problema, dissolveu-se uma quantidade adequada de amostra em NaCl 0,9 % (m/v), no sentido de se obter uma solução cuja concentração proteica esteja no intervalo entre 0,2 mg/mL e 2 mg/mL (European Pharmacopoeia 9.0). Na **Tabela 16**, presente em **Anexo 1 - Materiais e Métodos**, apresenta-se as diluições efetuadas para cada solução, de modo a obter uma concentração final de, aproximadamente, 1 mg/mL.

Na preparação da solução padrão, selecionou-se uma substância de referência apropriada à proteína a dosear, a BSA NIST, diluindo igualmente em NaCl 0,9 % (m/v), de modo a obter a mesma concentração aproximada de 1 mg/mL (European Pharmacopoeia 9.0). Todas as soluções foram preparadas em triplicado.

3.4.2 Técnica

Para a técnica da Absortividade Molar mantiveram-se, durante todo o ensaio, as soluções problema, a solução padrão e o líquido de compensação à mesma temperatura. Determinou-se a absorvância da solução problema e da solução padrão a 280 nm em *cuvettes* de quartzo, utilizando NaCl 0,9 % (m/v) como líquido de compensação. A resposta é linear no intervalo de concentrações proteicas a dosear, importante para a exatidão dos resultados (European Pharmacopoeia 9.0).

De modo a determinar a contribuição do efeito de difusão de luz na leitura de absorvância a 280 nm, calculou-se ainda a absorvância de cada solução em vários comprimentos de onda, nomeadamente 320 nm, 325 nm, 330 nm, 335 nm, 340 nm, 345 nm e 350 nm. De seguida, através de um gráfico do logaritmo da absorvância lida em função do logaritmo do comprimento de onda respetivo, determinou-se, por regressão linear, a curva de calibração que apresentava melhor ajuste dos pontos do gráfico (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

3.5.1 Preparação das Soluções

Para preparar a solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % (m/v), pesaram-se 9 g de cloreto de sódio e adicionaram-se 1000 mL de água purificada, agitando até se obter uma dissolução completa (Infarmed, 2011).

Para preparar a solução problema, dissolveu-se uma quantidade adequada de amostra em NaCl 0,9 % (m/v), no sentido de se obter um conjunto de soluções de concentrações diferentes (2,5 %, 5 %, 7,5 % e 10 %).

3.5.2 Técnica

Para realizar a análise de FT-IR, utilizou-se um espectroscópio de infravermelho da marca *Perkin Elmer*, modelo *Spectrum 400* e os cartões de filtro da mesma marca, como se apresenta na **Figura 11**.

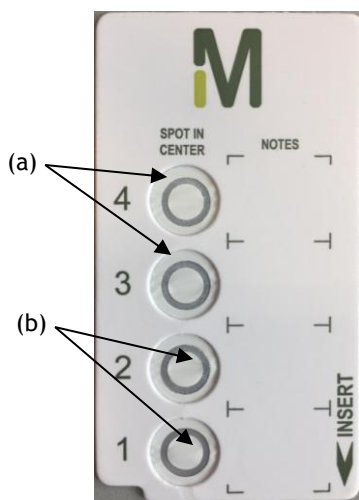


Figura 11 - Cartões de filtro utilizados na espectroscopia FT-IR: (a) anel hidrofóbico; (b) ponto hidrofílico.

Cada cartão contém um ponto hidrofílico rodeado por um anel hidrofóbico, de modo a reter o analito com o feixe de IV para uma aplicação e análise conveniente da amostra (Merck Millipore, 2013).

Utilizando esses cartões de filtro, as amostras foram pipetadas diretamente no centro da membrana. Deste modo, adicionaram-se 20 μL de amostra no ponto hidrofílico e esperaram-se entre 10 a 15 minutos no sentido de se obter uma secagem completa à temperatura ambiente (Strug et al., 2014).

4 Resultados e Discussão

4.1 Método de Kjeldahl

Para aceitação da validação do método, embora na literatura não estejam descritos valores específicos para estes parâmetros (Miller et al., 2000), avaliaram-se critérios importantes como a **exatidão**, que deveria ter uma recuperação obtida $\geq 90\%$, tendo-se obtido 98% , a **repetibilidade**, em que o coeficiente de variação (CV) deveria ser $\leq 10\%$, tendo-se obtido um valor de $0,31\%$ e a **precisão intermédia**, em que $CV \leq 10\%$, obtendo-se um valor de $1,96\%$ (Infarmed, 2014).

Relativamente aos critérios de aceitação do ensaio, efetuaram-se dois brancos para cada ensaio, nos quais os volumes de titulante medidos não deveriam exceder $0,300\text{ mL}$ (Infarmed, 2014), tendo-se obtido um valor médio de $0,254\text{ mL}$ para os ensaios de validação e de $0,236\text{ mL}$ para os restantes ensaios, sendo que o valor do branco corresponde à média dos dois brancos determinados. Para cada ensaio, efetuou-se a análise de uma amostra de referência em duplicado, L-Fenilalanina, em que os resultados obtidos deveriam ter um $CV \leq 5\%$ (Infarmed, 2014), sendo que se obteve uma média de $1,4\%$. Efetuou-se para cada ensaio um duplicado das amostras a analisar, em que os resultados obtidos em cada replicado deveriam apresentar um $CV \leq 5\%$ (Infarmed, 2014), tendo-se obtido um valor de $1,1\%$ como média de todos os resultados.

Em **Anexo 2 - Resultados e Discussão** apresenta-se as tabelas com os valores obtidos para cada replicado de amostra, para cada ensaio. De notar que todos os resultados foram calculados através de um fator de proteína de $6,25$.

Inicialmente procedeu-se à validação do método, onde se aferiu uma amostra de Octagam 5% , utilizando a BSA NIST, de modo a ser utilizado como novo MRI-d para ensaios de rotina do método do Biureto. Na **Tabela 3** apresentam-se os resultados obtidos para a BSA NIST, para a substância de referência e para o Octagam 5% , bem como o respetivo desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 3 - Valores médios obtidos para os ensaios de validação, para o método de Kjeldahl.

Amostra	Valor Teórico	Resultado Final	s	CV/ %
L-Fenilalanina	8,47 %	8,40 %	0,18	2,1
BSA NIST	67,38 g/L	70,32 g/L	1,60	2,3
Octagam 5 %	50 g/l	50,89 g/L	1,01	2,0

Para os ensaios de validação, o resultado final obtido para a L-Fenilalanina de 8,40 % foi um pouco inferior ao valor teórico mas, tendo em conta o desvio-padrão associado, esse valor é considerado aceitável. Para a BSA NIST o resultado final foi superior ao estimado, uma vez que o valor teórico estabelecido no certificado seria de 67,38 g/L \pm 1,38 g/L (66,00 - 68,76 g/L) e por isso, o resultado final ultrapassa esse valor em 4,4 %. Quanto ao Octagam 5%, o valor obtido de 51 g/L foi bastante semelhante ao teórico, estando dentro do intervalo de especificação do produtor de 45 - 55 g/L, sendo que o resultado obtido pelo produtor foi de 50 g/L.

Por fim, realizaram-se 3 ensaios para as amostras escolhidas, utilizando a L-Fenilalanina como substância de referência. Na **Tabela 4** apresenta-se os valores médios obtidos para cada solução nos ensaios realizados, bem como o respetivo desvio-padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 4 - Valores médios obtidos para cada amostra, para o método do Kjeldahl.

Amostra	Valor Teórico	Resultado Final	<i>s</i>	CV/ %
L-Fenilalanina	8,47 %	8,48 %	0,06	0,67
Flebogamma DIF 5 %	45 - 55 g/L	49,76 g/L	0,54	1,09
Flebogamma DIF 10 %	90 - 110 g/L	100,20 g/L	0,74	0,74
Octagam 5 %	45 - 55 g/L	51,57 g/L	0,79	1,52
Octagam 10 %	90 - 110 g/L	99,10 g/L	1,19	1,20

Analisando os resultados obtidos, todos os ensaios obtiveram um coeficiente de variação inferior a 5 % (ver **Tabela 4**) e todas as amostras cumpriram os critérios de especificação do produtor. Relativamente à substância de referência, a L-Fenilalanina, o valor obtido de 8,48 % foi bastante semelhante ao valor teórico de 8,47 %, o que indica que este método representa uma quantificação verdadeira do teor de azoto em proteína.

Em todas as amostras se obteve um resultado final quase igual ao valor teórico. Para o Flebogamma DIF 5 %, o resultado final obtido foi de 50 g/L, estando dentro do intervalo 45 - 55 g/L e sendo igual ao resultado obtido pelo produtor de 50 g/L. Para o Flebogamma DIF 10 %, obteve-se um valor de 100 g/L, igualmente dentro do intervalo 90 - 110 g/L mas ligeiramente superior ao valor obtido pelo produtor de 97 g/L. Quanto ao Octagam 5 %, obteve-se um resultado final de 52 g/L, estando conforme no intervalo 45 - 55 g/L mas acima do resultado obtido pelo produtor de 49 g/L. Por fim, para o Octagam 10 % obteve-se um valor de 99 g/L, também dentro do intervalo 90 - 110 g/L e superior ao valor de 97 g/L obtido pelo produtor.

Para este método não se estudou nenhuma Albumina, por conter triptofano como excipiente, bem como Gammanorm e Rhesonativ, que contêm glicina como excipiente, uma vez que são aminoácidos com azoto na sua composição, o que iria influenciar os resultados finais pelo método de Kjeldahl, obtendo-se uma quantificação maior do que a esperada, pois não iria representar uma quantificação da verdadeira proteína, mascarando os resultados.

Com isto, conclui-se que o método de Kjeldahl é um bom método de quantificação de proteínas e absoluto, obtendo-se resultados muito próximos dos teóricos, mas, é um método bastante demorado, uma vez que é necessário preparar as amostras, efetuar a digestão durante 70 minutos, seguido do arrefecimento de aproximadamente 30 minutos e por fim, leitura das amostras na unidade de destilação e titulação, fazendo que com seja um método pouco automatizado. Outro aspeto a citar baseia-se na preparação das soluções, devido ao seu elevado tempo, bem como a titulação do ácido sulfúrico utilizado, representando também um processo bastante demorado. Por último, este método está sujeito a libertação de vapores prejudiciais à saúde humana, devido às elevadas temperaturas de manuseamento do ácido sulfúrico, necessitando de equipamentos de proteção coletiva (*Hotte*) para segurança dos utilizadores, o que se torna um método pouco prático para uma utilização em rotina.

4.2 Método do Biureto

Para o método do Biureto, realizou-se uma curva padrão em cada ensaio e relativamente aos critérios de aceitação dessa curva padrão, segundo a literatura, deveria ter um coeficiente de correlação $\geq 0,995$, o desvio-padrão do declive deveria ser inferior a 5 % e a ordenada na origem deveria conter a origem (Miller et al., 2000). No entanto, o Infarmed não considera estes parâmetros relevantes, sendo que, para a reta de calibração ser válida, esta deveria ter um coeficiente de correlação $\geq 0,99$ (Infarmed, 2015), tendo-se obtido uma média de 0,9999 e a soma dos residuais deveria ser $\leq 0,0010$ (Infarmed, 2015), obtendo-se uma média de 0,0001. Deste modo, os valores de absorvância obtidos para cada triplicado de amostra de referência deveriam ter um CV $\leq 10\%$ (Infarmed, 2015), sendo que o valor obtido foi de 1,3 %.

Quanto aos critérios de aceitação da amostra, de notar que os valores de absorvância obtidos para cada triplicado de amostra deveriam apresentar um CV $\leq 10\%$ (Infarmed, 2015), tendo-se obtido um valor de 1,2 %.

Em Anexo 2 - Resultados e Discussão apresenta-se as tabelas com os valores obtidos para cada replicado de amostra, para cada ensaio.

Na **Figura 12** observa-se a comparação entre as retas de calibração de MRI-d e de BSA NIST, obtidas no *software* CombiStats™, para uma análise estatística utilizando o modelo de linhas paralelas, de modo a verificar se havia paralelismo entre as duas curvas. É possível verificar que existe paralelismo mas não linearidade, o que indica que não é possível concluir se existe efeito de matriz na gama de trabalho avaliada, ou seja, se há interferentes nas soluções e conseqüentemente, este SRM pode ser utilizado como alternativa à substância utilizada como padrão em ensaios de rotina (Octagam 5 %).

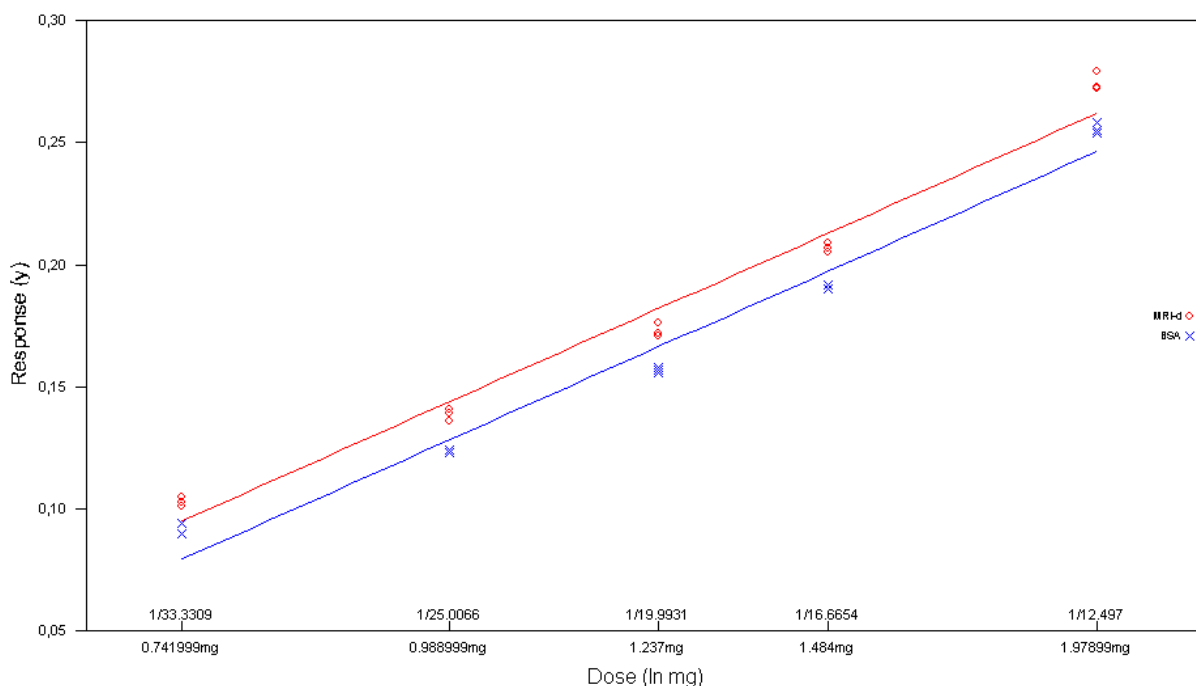


Figura 12 - Comparação entre MRI-d e BSA NIST obtido no *software* CombiStats™.

Relativamente aos critérios de validação, todos os coeficientes de variação foram inferiores a 10 % e o resultado final obtido para a BSA NIST, utilizando o MRI-d como reta de calibração (69,26 mg/mL), está muito próximo do obtido pelo produtor (69,58 mg/mL), o que permite concluir que a curva de BSA NIST pode ser uma alternativa viável à reta de MRI-d mas, para isso, será necessário realizar uma análise estatística aprofundada num futuro trabalho.

De seguida, avaliou-se os resultados obtidos para cada amostra, tendo especial atenção aos coeficientes de variação (CV) e aos resultados finais, de modo a concluir se o valor estava dentro do intervalo especificado pelo produtor.

Na **Tabela 5** apresenta-se os valores médios dos 3 ensaios obtidos, para cada lote de cada amostra, de concentração, absorvância e resultado final, para o método do Biureto, bem como o desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) associados à absorvância.

Tabela 5 - Valores médios obtidos para cada lote de amostra, para o método do Biureto.

Amostra	Lote	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final	s	CV/ %
Albumina Humana 20 %	1	1,363	0,172	21,8 % (m/v)	0,002	1,2
	2	1,367	0,173	21,9 % (m/v)	0,002	1,0
	3	1,355	0,172	21,7 % (m/v)	0,003	1,5
Albunorm 4 %	1	1,417	0,181	4,3 % (m/v)	0,000	0,0
	2	1,426	0,182	4,3 % (m/v)	0,001	0,6
	3	1,426	0,182	4,3 % (m/v)	0,001	0,3
Albunorm 5 %	1	1,324	0,169	5,30 % (m/v)	0,002	1,4
	2	1,322	0,170	5,29 % (m/v)	0,003	1,5
	3	1,330	0,171	5,32 % (m/v)	0,002	0,9
Albunorm 20 %	1	1,298	0,166	20,8 % (m/v)	0,002	0,9
	2	1,316	0,168	21,0 % (m/v)	0,002	0,9
	3	1,320	0,168	21,1 % (m/v)	0,002	1,2
Albunorm 25 %	1	1,342	0,171	26,8 % (m/v)	0,001	0,7
	2	1,340	0,170	26,8 % (m/v)	0,001	0,7
	3	1,366	0,174	27,3 % (m/v)	0,003	1,8
Flebogamma DIF 5 %	1	1,354	0,173	54 mg/mL	0,001	0,6
	2	1,382	0,176	55 mg/mL	0,001	0,3
Flebogamma DIF 10 %	1	1,337	0,171	107 mg/mL	0,002	1,0
	2	1,353	0,173	108 mg/mL	0,002	1,2
Gammanorm	1	1,458	0,188	175 mg/mL	0,004	2,1
	2	1,444	0,186	174 mg/mL	0,002	0,8
	3	1,418	0,183	170 mg/mL	0,001	0,3
Octagam 5 %	1	1,370	0,174	5,5 % (m/v)	0,001	0,7
	2	1,389	0,176	5,5 % (m/v)	0,001	0,6
	3	1,382	0,175	5,5 % (m/v)	0,001	0,7

Octagam 10 %	1	1,329	0,170	10,6 % (m/v)	0,001	0,7
	2	1,359	0,173	10,9 % (m/v)	0,001	0,3
	3	1,342	0,172	10,7 % (m/v)	0,001	0,7
Rhesonativ	1	1,447	0,183	174 mg/mL	0,012	6,5
	2	1,465	0,185	176 mg/mL	0,004	2,4
	3	1,446	0,183	174 mg/mL	0,006	3,4

Para as Albuminas estudadas, todos os ensaios obtiveram um coeficiente de variação inferior a 10 % (ver Tabela 5), como seria esperado. Relativamente ao resultado final, para a Albumina Humana 20 %, nenhum dos lotes cumpriu os critérios de especificação do produtor, uma vez que se obteve um valor de 21,8, 21,9 e 21,7 % (m/v), fora do intervalo 19,0 - 21,0 % (m/v). O mesmo se verifica para o Albunorm 4 %, em que se obteve um valor de 4,3 % (m/v) para todos os lotes, valor fora do intervalo 3,8 - 4,2 % (m/v) e para o Albunorm 5 %, onde se obteve um valor de 5,30, 5,29 e 5,32 % (m/v), fora do intervalo 4,75 - 5,25 % (m/v). Relativamente ao Albunorm 20 %, apenas duas das amostras cumpriram os critérios de especificação do produtor, obtendo-se valores de 20,8 e 21,0 % (m/v), visto que na terceira amostra se obteve um valor de 21,1 % (m/v), fora do intervalo 19,0 - 21,0 % (m/v). No entanto, o Albunorm 25 % segue o mesmo modelo que os três primeiros, onde nenhum dos lotes cumpriu os critérios de especificação do produtor, pois obteve-se um valor de 26,8 % (m/v) para os dois primeiros e de 27,3 % (m/v) para o último, fora do intervalo 23,8 - 26,2 % (m/v).

Relativamente às Imunoglobulinas, todos os ensaios obtiveram um coeficiente de variação inferior a 10 % e todos os lotes de cada amostra cumpriram os critérios de especificação do produtor. Para o Flebogamma DIF 5 %, obteve-se um resultado final de 54 e 55 mg/mL, dentro do intervalo 45 - 55 mg/mL, sendo que o resultado determinado pelo produtor foi de 48 e 49 mg/mL, respetivamente. Para o Flebogamma DIF 10 %, obteve-se um valor de 107 e 108 mg/mL, dentro do intervalo 90 - 110 mg/mL, estando acima do valor obtido pelo fornecedor de 97 mg/mL para ambos os lotes. Quanto ao Gammanorm, obteve-se os valores de 175, 174 e 170 mg/mL, dentro do intervalo 149 - 182 mg/mL, tendo o produtor obtido um resultado de 164, 179 e 164 mg/mL, respetivamente. Para o Octagam 5 % obteve-se o valor de 5,5 % (m/v) para todos os lotes, dentro do intervalo 4,5 - 5,5 % (m/v), sendo que o resultado obtido pelo produtor foi de 5,0 % (m/v) para todos os lotes. Quanto ao Octagam 10 % os valores obtidos foram de 10,6, 10,9 e 10,7 % (m/v), dentro do intervalo 9,0 - 11,0 % (m/v), tendo o produtor obtido um valor de 9,7 % (m/v) para o primeiro e de

10,0 % (m/v) para os outros dois lotes. Por fim, para o Rhesonativ, obteve-se um resultado final de 174, 176 e 174 mg/mL, dentro do intervalo 149 - 182 mg/mL, valores inferiores aos obtidos pelo produtor de 166 e 165 mg/mL, sendo que para o lote 3 não há informação deste valor.

O método do Biureto é relativamente simples e rápido, as soluções são de fácil preparação, bem como as amostras, não apresenta nenhum fator prejudicial à saúde humana e embora não se tenham obtido resultados positivos para soluções de Albumina, esta metodologia é uma boa opção para ser utilizado em ensaios de rotina.

4.3 Método de Lowry

Para o método de Lowry, realizou-se uma curva padrão em cada ensaio e para aceitação dos parâmetros de validação, avaliou-se a **linearidade** que, segundo a literatura, deveria ter um coeficiente de correlação $\geq 0,995$, o desvio-padrão do declive deveria ser inferior a 5 % e a ordenada na origem deveria conter a origem (Miller et al., 2000).

Contudo, o Infarmed não considera esses os parâmetros de aceitação da reta de calibração, sendo que a relação entre a absorvância e a concentração de proteína existente nas amostras teria de ser linear dentro do limite de concentração referido para as soluções padrão. Para isso, era necessário que a reta padrão tivesse um coeficiente de correlação não inferior a 0,99 (Infarmed, 2011), tendo-se obtido um valor de 0,9989 e que os valores de absorvância obtidos para cada triplicado de padrão e de amostra apresentassem um coeficiente de variação inferior a 10 % (CV < 10 %) (Infarmed, 2011), obtendo-se um valor de 2,8 % para o padrão e de 2,7 % para a amostra.

Na **Tabela 6** apresenta-se os valores médios dos 3 ensaios obtidos, para cada lote de cada amostra, de concentração, absorvância e resultado final, para o método de Lowry, bem como o desvio-padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV) associados à absorvância.

Tabela 6 - Valores médios obtidos para cada amostra, para o método de Lowry.

Amostra		Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final	<i>s</i>	CV/ %
Albumina Humana 20 %		0,097	0,233	19,4 % (m/v)	0,008	3,6
Gammanorm		0,131	0,307	217 mg/mL	0,009	2,8
Octagam 5 %	1	0,133	0,308	6,7 % (m/v)	0,014	4,5
	2	0,138	0,316	6,9 % (m/v)	0,004	1,3

	3	0,136	0,315	6,8 % (m/v)	0,005	1,6
Octagam 10 %	1	0,135	0,313	13,5 % (m/v)	0,008	2,5
	2	0,140	0,322	14,0 % (m/v)	0,005	1,6
	3	0,134	0,309	13,4 % (m/v)	0,012	3,9

Em **Anexo 2 - Resultados e Discussão** apresenta-se os valores obtidos detalhadamente para cada amostra, sendo que em todos os ensaios se obteve um CV inferior a 10 % (ver **Tabela 6**).

Para a Albumina Humana 20 %, o resultado final de 19,4 % (m/v), proveniente da média dos 3 ensaios, cumpre os parâmetros de especificação do produtor, mas, separadamente, apenas no último ensaio se obteve um valor no intervalo 19,0 - 21,0 % (m/v), sendo que nos restantes ensaios esse valor se encontrava abaixo do limite.

Relativamente ao Gammanorm, em nenhum dos ensaios se obteve um resultado final no intervalo 149 - 182 mg/mL, sendo que a média dos 3 foi de 216 mg/mL, valor superior a esse limite e do produtor de 164 mg/mL. Para o Octagam 5 %, o resultado final não cumpre a especificação, sendo que se obteve um valor de 6,7, 6,9 e 6,8 % (m/v), acima do intervalo 4,5 - 5,5 % (m/v), tendo o produtor obtido um valor de 5,0 % (m/v) para todos os lotes. O mesmo aconteceu para o Octagam 10 %, uma vez que o resultado final, para cada lote, foi de 13,5, 14,0 e 13,4 % (m/v), estando fora do intervalo 9,0 - 11,0 % (m/v) especificado pelo produtor, uma vez que o resultado obtido pelo mesmo foi de 9,7 % (m/v) para o primeiro e de 10,0 % (m/v) para os dois últimos.

O método de Lowry é sensível ao triptofano e como as Albuminas contêm esse aminoácido como excipiente, o reagente de Folin-Ciocalteu reage com os resíduos do triptofano, causando um resultado final aceitável, ao contrário dos restantes fármacos que excederam o limite de especificação do produtor. Nesta metodologia trabalhou-se com diluições muito elevadas, fazendo com que os volumes de soluto fossem muito baixos, o que pode indicar uma má caracterização da solução em termos de proteína, pois a alíquota retirada pode não representar exatamente a composição do fármaco em questão, podendo ser outro motivo para o fracasso dos resultados obtidos. Deste modo, este método não é uma boa opção para realizar ensaios de rotina.

4.4 Absortividade Molar

Para a Absortividade Molar, não existem parâmetros de linearidade na literatura, para aceitação da reta de calibração. Deste modo, leu-se a absorvância, tanto para a substância padrão como para cada amostra, num comprimento de onda de 280 nm, bem como numa gama de comprimentos de onda específicos (250 - 300 nm), de modo a calcular a contribuição do efeito de difusão da luz na absorvância lida em 280 nm (Farmacopeia Portuguesa 9.0). Na **Tabela 7** apresentam-se as absorvâncias obtidas para a substância padrão, BSA NIST, para cada comprimentos de onda, bem como o desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 7 - Valores obtidos para a substância padrão, para a Absortividade Molar.

BSA NIST	Comprimento de Onda/ nm							
	280	320	325	330	335	340	345	350
Absorvância	0,678	0,018	0,015	0,012	0,010	0,009	0,008	0,008
s	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002
CV/ %	0,31	14,25	17,16	22,05	26,46	22,30	24,98	21,65

Através dos resultados obtidos, efetuou-se um gráfico do logaritmo da absorvância lida em função do logaritmo do respetivo comprimento de onda. De seguida, através de regressão linear, determinou-se qual seria o valor da absorvância que se deveria obter para um comprimento de onda de 280 nm, tendo dado uma absorvância corrigida de 0,055. Posteriormente, subtraiu-se esse valor à absorvância lida através do espectralfotómetro, obtendo-se um valor de 0,623.

Deste modo, realizou-se igualmente uma regressão linear para cada uma das restantes amostras e com a equação obtida determinou-se a absorvância corrigida. De seguida, através da **Equação (4.1)**, determinou-se a concentração de proteína na solução problema (C_u), onde C_s representa a concentração de proteína na solução padrão e A_u e A_s representam as absorvâncias corrigidas da solução problema e da solução padrão, respetivamente (Farmacopeia Portuguesa 9.0).

$$C_u = C_s \times (A_u/A_s) \quad (4.1)$$

Na **Tabela 8** apresenta-se as absorvâncias corrigidas, a concentração de proteína e o resultado final obtido para cada lote de amostra analisado, para a Absortividade Molar, bem como o desvio-padrão (s) e coeficiente de variação (CV) associados à absorvância.

Tabela 8 - Resultados obtidos para cada amostra, para a Absortividade Molar.

Amostra		Absorvância (A_u)	Concentração (C_u)/ g/L	Resultado Final/ g/L
Flebogamma DIF 5 %	1	1,361	147,19	7359
	2	1,377	148,86	7443
Flebogamma DIF 10 %	1	1,431	154,71	15471
	2	1,372	148,33	14833
Octagam 5 %	1	1,384	149,59	7479
	2	1,407	152,09	7605
	3	1,377	148,83	7442
Octagam 10 %	1	1,364	147,50	14750
	2	1,386	149,85	14985
	3	1,342	145,12	14512

Pelos resultados obtidos é possível concluir que este método não é de todo o mais adequado para quantificar proteínas, visto ser um método que se fundamenta na absorção de luz ultravioleta a 280 nm e a maioria das substâncias existentes nas proteínas absorvem neste comprimento de onda. Deste modo, os resultados finais obtidos, todos eles valores não realistas, podem representar uma quantificação de todos os componentes da proteína, nomeadamente dos excipientes, mascarando, assim, os resultados que deveriam ser obtidos para este método, no sentido de apresentarem conformidade com o intervalo de especificação do produtor.

As soluções de Flebogamma DIF 5 % e 10 % contêm d-sorbitol como excipiente, enquanto que os Octagam 5 % e 10 %, são soluções que contêm maltose como excipiente, substâncias que podem absorver no ultravioleta e provocar um aumento significativo nos resultados.

4.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Para a espectroscopia FT-IR, realizou-se um estudo preliminar para verificar se este método poderia ser utilizado em quantificação de proteínas. Nesse sentido, analisou-se

apenas uma solução de Octagam, fazendo diluições seriadas, uma vez que representa um dos produtos mais estudados na instituição.

Deste modo, através de uma amostra de Octagam 10 %, realizando-se diluições de modo a obter soluções com uma concentração de 7,5 %, 5 % e 2,5 % e procedeu-se a uma leitura de espectroscopia FT-IR, onde se obteve o gráfico da **Figura 13**, expresso em absorvância em função do número de onda.

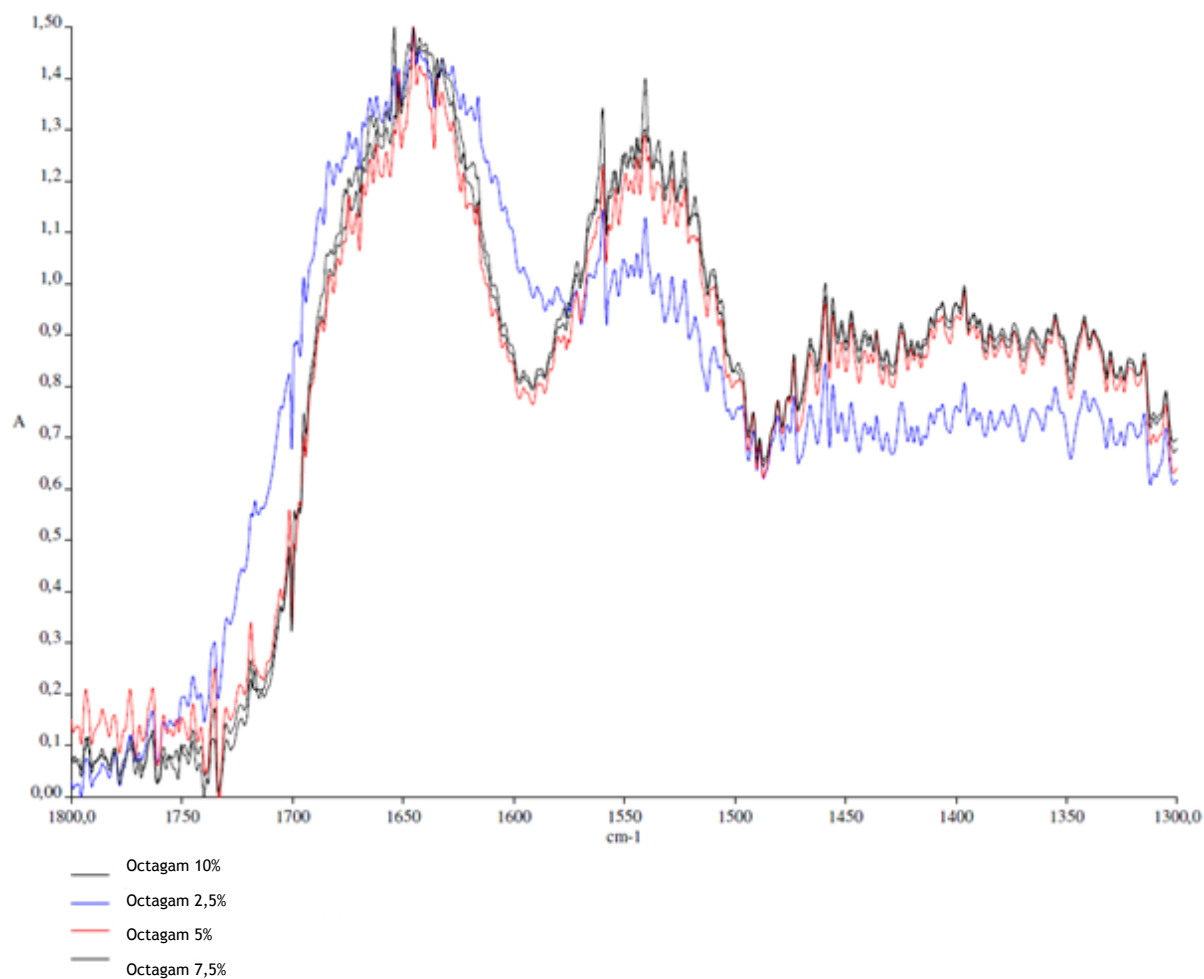


Figura 13 - Gráfico obtido por FT-IR para várias diluições de Octagam 10 %.

Após várias tentativas de obtenção de resultados viáveis, não foi possível determinar se esta metodologia poderia ser usada para o efeito. Através da **Figura 13** é possível observar que o gráfico obtido apresenta bastante ruído, não havendo uma resposta linear no comprimento de onda específico do infravermelho. Deste modo, não se consegue, de todo, determinar os vários grupos funcionais existentes na amostra analisada, sendo que no número de onda correspondente à banda Amida I ($1600 - 1690 \text{ cm}^{-1}$) e à banda Amida II ($1480 - 1575 \text{ cm}^{-1}$) não se consegue distinguir as diferentes amostras, havendo uma resposta perceptível mas não clara.

De notar que esta metodologia requer um tempo de estudo superior ao tempo disponível do trabalho em questão. Por esta razão, não foi possível otimizar as condições de operação envolvidas. Um dos parâmetros a otimizar será o volume pipetado de amostra para os cartões de filtro, uma vez que na literatura refere uma pipetagem de 2 µL, que representa um volume demasiado pequeno, tendo-se otimizado para 20 µL por ser um volume mínimo aceitável de pipetagem reversa, mas que requer um tempo de secagem superior ao normal, o que pode influenciar os resultados em questão.

Uma vez que se considerou o método de Kjeldahl e o método do Biureto as melhores metodologias para quantificação de proteínas, realizou-se uma comparação dos resultados obtidos para os mesmo lotes de amostra estudados. Na **Tabela 9** apresenta-se essa comparação, bem como o limite de especificação e o resultado obtido pelo produtor.

Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos para o método de Kjeldahl e para o método do Biureto.

Amostra	Intervalo de Especificação	Kjeldahl	Biureto	Produtor
Flebogamma DIF 5 %	45 - 55 g/L	49,76 g/L	55 g/L	49 g/L
Flebogamma DIF 10 %	90 - 110 g/L	100,20 g/L	108 g/L	97 g/L
Octagam 5 %	45 - 55 g/L	51,57 g/L	55 g/L	50 g/L
Octagam 10 %	90 - 110 g/L	99,10 g/L	107 g/L	97 g/L

Através da comparação de amostras é notório que os resultados do método de Kjeldahl são mais próximos dos valores obtidos pelo produtor, verificando-se ainda que para o método do Biureto esses resultados estão muito próximos ao limite superior do intervalo de especificação. Assim, conclui-se que o Kjeldahl é um método absoluto enquanto que o Biureto é um método relativo, sendo o primeiro considerado melhor para quantificar proteínas. No entanto, devido aos diversos fatores negativos mencionados anteriormente, a sua utilização em rotina torna-se pouco prática.

Na **Tabela 10** apresenta-se a comparação das vantagens e limitações, apresentadas anteriormente em **Contexto e Estado da Arte**, sendo que se realizou um balanço da veracidade destes aspetos sentidos no decorrer do trabalho.

Tabela 10 - Comparação das vantagens e limitações da literatura e práticas.

Método	Vantagens		Limitações	
	Literatura	Prático	Literatura	Prático
Kjeldahl	- Método padrão de determinação do conteúdo de azoto numa solução	- Não é um método padrão nem universal por não se poder quantificar soluções que contenham excipientes com azoto	- Não fornece uma medição da verdadeira proteína tendo azoto como excipiente	✓
	- Universal		- O uso de ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas pode provocar algum tipo de perigo	✓
	- Tem alta precisão e é reprodutível	✓		
	- Método relativamente simples e não é caro	✓	- Método demorado	✓
Biureto	- Utiliza reagente de baixo custo	✓	- Não é muito sensível	✓
	- Rápido	✓		
	- Não apresenta grande variação de absorvidade para diferentes proteínas	✓	- Tem vindo a ser substituído por outros métodos mais sensíveis	- É o método utilizado em ensaios de rotina pelo Infarmed
Lowry		✓	- Suscetível a muitos interferentes	✓
	- Simples, sensível e preciso		- Longo tempo de análise	- Método pouco demorado comparado com outros

	<ul style="list-style-type: none"> - Melhor exatidão e menor consumo de amostra 	<ul style="list-style-type: none"> - Método com pouca exatidão 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande variabilidade de absorvância para diferentes proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> - Para diferentes proteínas os valores de absorvância são semelhantes
Absortividade Molar	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido e não destrói a amostra 	<ul style="list-style-type: none"> - Método um pouco demorado 	<ul style="list-style-type: none"> - Está sujeito a muitos interferentes 	✓
	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizado para identificar frações contendo proteína, ou para estimar a concentração de uma amostra pura 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é um método muito utilizado, uma vez que os resultados não representam a realidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Várias substâncias absorvem no UV, fazendo com que os resultados sejam pouco viáveis 	✓
FT-IR	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido e sensível 	<ul style="list-style-type: none"> - Método um pouco demorado na preparação 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de detetar átomos e iões monoatômicos 	✓
	<ul style="list-style-type: none"> - Mecânica simples 	✓		
	<ul style="list-style-type: none"> - Calibrado internamente 	✓		
	<ul style="list-style-type: none"> - Ferramenta ideal para detetar grupos funcionais 	✓	<ul style="list-style-type: none"> - Não pode ser utilizada para elucidar a estrutura completa de uma molécula desconhecida 	✓

5 Conclusões

O principal objetivo do trabalho era a avaliação das condições de utilização de um método padrão para doseamento de proteínas, em condições de utilização num laboratório de controlo de qualidade, para doseamento de proteína em medicamentos constituídos por soluções concentradas de Albumina e Imunoglobulinas Humanas injetáveis. Para isso, procedeu-se à comparação de alguns desses métodos e analisou-se os resultados obtidos para cada uma dessas metodologias.

Pelos resultados obtidos pelo método de Kjeldahl, conclui-se que este método é o que melhor quantifica as proteínas em análise, uma vez que os valores determinados são bastante semelhantes aos especificados pelo produtor. No entanto, não foram estudadas soluções de Albumina, Gammanorm e Rhesonativ, devido à existência de excipientes com azoto, o que provocaria resultados finais superiores aos esperados.

Através dos resultados obtidos nos ensaios realizados pelo método do biureto, é possível concluir que o padrão de BSA NIST pode ser uma boa alternativa à solução de MRI-d (Octagam 5 %) utilizada em rotina em ensaios deste tipo, uma vez que as retas de calibração obtidas apresentam paralelismo, embora a primeira apresente valores de absorvância ligeiramente inferiores relativamente aos obtidos em rotina, para os mesmos valores de concentração, sendo que para isso será necessário proceder a uma análise estatística mais aprofundada.

Quanto aos ensaios realizados para cada amostra, para o método do Biureto, observou-se que os resultados obtidos para soluções de Albumina não cumpriam os critérios de especificação, ao contrário do que foi obtido para Imunoglobulinas. Isto permite concluir que as Albuminas não são adequadas para realização de doseamento de proteínas totais, ou que os critérios de especificação terão de ser adaptados para esta nova reta de calibração, uma vez que para as Imunoglobulinas se obtiveram resultados finais ligeiramente mais elevados do que os teóricos e do que os obtidos em ensaios de rotina.

Para o método de Lowry estudou-se soluções de Albumina e Imunoglobulinas, sendo que apenas para as primeiras amostras se obteve um resultado final dentro do intervalo de especificação do produtor, enquanto que para as Imunoglobulinas se obtiveram valores bastantes superiores ao esperado. Isto indica que para o método de Lowry, as Imunoglobulinas podem conter algum tipo de excipiente que faz com que este valor ultrapasse o limite especificado, nomeadamente tirosina e triptofano.

Para a Absortividade Molar, os resultados obtidos foram não realistas, o que indica à partida que este método não pode ser utilizado como ensaio de rotina para quantificação de

proteínas. Este método torna-se pouco fiável visto que muitas substâncias absorvem no ultravioleta, num comprimento de onda de 280 nm, o que pode mascarar os resultados, não se obtendo uma quantificação da verdadeira proteína.

Relativamente à espectroscopia FT-IR, o espectro obtido indica que este método não pode ser utilizado para quantificação de proteínas porque, apesar de as soluções apresentarem absorvância num número de onda correspondente às bandas Amido I e Amido II, não é possível distinguir os diferentes grupos funcionais. O espectro IV obtido apresenta muito ruído, não sendo uma resposta linear, concluindo que este método não se adequa ao propósito nem pode ser utilizado para soluções de Albumina e Imunoglobulinas.

Face ao exposto, não se identificou um método padrão universal para doseamento de proteínas, não se realizando o objetivo inicial do trabalho. Contudo, após um balanço final dos resultados, considerou-se que o método do Biureto é a melhor metodologia para quantificar proteínas. Embora o método de Kjeldahl tivesse apresentado os resultados mais próximos da realidade, é um método bastante demorado e com libertação de vapores ácidos que se tornam prejudiciais à saúde humana. Para os restantes métodos, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Por esse motivo, não representam uma boa opção para quantificação de proteínas em rotina.

Deste modo, o Infarmed conseguiu concluir que os ensaios realizados em rotina, pelo método do Biureto, representam uma boa caracterização de proteínas e que é a melhor metodologia para o efeito.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

O trabalho realizado teve como objetivo a descoberta de um método padrão universal para doseamento de proteínas, fazendo-se um estudo comparativo de alguns desses métodos, no sentido de avaliar qual seria mais adequado para ser utilizado como padrão, em ambiente de Controlo de Qualidade e de Libertação Oficial de Lote.

O objetivo principal do trabalho não foi realizado pois, para cada uma das metodologia estudadas, existem vantagens e limitações que fazem com que nenhum dos métodos seja perfeito e infalível. Deste modo, não foi possível concluir o padrão universal para doseamento de proteínas, tendo-se optado pelo método do Biureto para ensaios de rotina.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Para o método de Kjeldahl realizaram-se ensaios de recuperação, de modo a avaliar se o antigo MRI-d (Octagam 5 %) utilizado em ensaios de rotina no método do Biureto, apresentando expiração do prazo de validade, mantinha o mesmo título e apresentava estabilidade. Esses ensaios não foram utilizados no processo de validação, provando que essa solução se manteve estável ao longo do tempo.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

A maior limitação deste trabalho foi o tempo de estudo, tendo sido inferior ao necessário para a realização de um estudo desta dimensão, devido, principalmente, à avaria de um equipamento fulcral que obrigou a uma paragem significativa do projeto.

Num trabalho futuro, com um tempo de análise alargado, deve ser efetuado um estudo aprofundado de todas as técnicas realizadas, analisando todas as amostras de Albuminas e Imunoglobulinas em cada método, bem como uma análise de um maior número de lotes de amostra, para comprovar a veracidade dos resultados.

Para a espectroscopia FT-IR, torna-se necessário otimizar o processo de modo a obter uma resposta no espectro linear, com ausência de ruído no mesmo.

Outra hipótese passa por analisar outras técnicas de modo a avaliar se as mesmas podem ser utilizadas para doseamento de proteínas. Deste modo, a realização da técnica de

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) poderá ser uma boa opção, uma vez que se baseia na separação de misturas, tendo vindo a ser bastante utilizada na identificação e quantificação de compostos ativos, além de ser uma metodologia que apresenta baixo custo, alta pureza, seletividade e linearidade.

6.4 Apreciação Final

O trabalho desenvolvido permitiu ao Infarmed concluir se os ensaios realizados em rotina obedeciam os critérios estabelecidos e se a escolha destes métodos é a mais acertada, visto que o ensaio realizado em rotina é o método do Biureto, para Imunoglobulinas, realizando-se também o método de Kjeldahl.

7 Referências

- Aschermann, Katja; Lutter, Petra; Wattenberg, Andreas. Current Status of Protein Quantification Technologies. *BioProcess Technical*. **2008**, 44-53.
- Barik, Alok; Priyadarsini, Indira K.; Mohan, Hari. Photophysical Studies on Binding of Curcumin to Bovine Serum Albumin. **2003**, 77(6), 597-603.
- Bartolucci, Alfred A.; Singh, Karan P.; Bae, Sejong. *Introduction to Statistical Analysis of Laboratory Data*. New Jersey: Wiley. **2016**.
- Bertolini, Joseph; Goss, Neil; Curling, John. Intravenous Immunoglobulin G from human plasma - Purification concepts and important quality criteria. In: *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use*. New Jersey: Wiley. **2013**, 185-205.
- Capito, Florian; Skudas, Romas; Kolmar, Harald; Hunzinger, Christian. Mid-infrared spectroscopy-based antibody aggregate quantification in cell culture fluids. *Biotechnology Journal*. **2013**, 8(8), 912-917.
- Capito, Florian; Skudas, Romas; Kolmar, Harald; Stanislawski, Bernd. Host Cell Protein Quantification by Fourier Transform Mid Infrared Spectroscopy (FT-MIR). *Biotechnology and Bioengineering*. **2013**, 110(1), 252-259.
- Chromy, Vratislav; Vinklárková, Bára; Sprongl, Ludek; Bittová, Miroslava. The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. I. A Review of Kjeldahl Methods Adopted by Laboratory Medicine. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2015**, 45(2), 112-118.
- Chutipongtanate, Somchai; Watcharatanyatip, Kamolwan; Homvises, Teerada; Jaturongkakul, Kewalee; Thongboonkerd, Visith. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta*. **2012**, 98, 123-129.
- EMD Millipore. *The Direct Detect™ Biomolecular Quantitation System*, USA: s.n. **2012**.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. *OMCL Network of the Council of Europe General Document*, s.l.: s.n. **2014**.
- European Pharmacopoeia 9.0. 2. Methods of Analysis. Em: *European Pharmacopoeia 9.0*. s.l.:s.n., 172-175.

- Farmacopeia Portuguesa 9.0. 2. Métodos Analíticos. Em: *Farmacopeia Portuguesa 9.0.* s.l.:s.n., 161-164.
- Gelamo, E.L.; Silva, C.H.T.P.; Imasato, H.; Tabak, M.. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* **2002**, 1594(1), 84-99.
- Gopinath, Sudha V.; Agnihotri, Niharika; Prasad, J. P.; E., Madhu; V., Girija L.; Ali, Md. Daud. Selection of Protein Standards in Estimation of Total Protein Content in Commercially Available Intravenous Immunoglobulin (IVIG) Preparations by Biuret Method and its Comparison with Kjeldahl Method: Guidance to IVIG Manufacturers. *International Journal of Science an Research (IJSR).* **2015**, 4(10), 2121-2125.
- Griffiths, Peter R.; Haseeth, James A.. *Fourier Transform Infrared Spectrometry.* 2^a ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience. **2007**.
- Gülseren, İbrahim; Güzey, Demet; Bruce, Barry D.; Weiss, Jochen. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry.* **2007**, 14(2), 173-183.
- Infarmed. *Quantificação de Proteína Total pelo Método de Lowry*, s.l.: s.n. **2011**.
- Infarmed. *Solução de Hidróxido de Sódio 1,5 M*, s.l.: s.n. **2011**.
- Infarmed. *Solução salina a 0,9%*, s.l.: s.n. **2011**.
- Infarmed. *Folheto Informativo: Informação para o Utilizador*, s.l.: s.n. **2013**.
- Infarmed. *Reagente de Biureto*, s.l.: s.n. **2013**.
- Infarmed. *Solução de Neutralização dos Vapores Ácidos*, s.l.: s.n. **2013**.
- Infarmed. *Doseamento de proteínas totais pelo método de Kjeldahl*, s.l.: s.n. **2014**.
- Infarmed. *Doseamento de proteínas totais em imunoglobulinas pelo método do Biureto*, s.l.: s.n. **2015**.
- Infarmed. *O Futuro Preparado*. Lisboa: Porto Editora. **2015**.
- Infarmed. *Apresentação*. [Online] Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional> [Acedido em 8 Fevereiro 2017]. **2016**.
- Infarmed. *Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ)*. [Online] Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dcq>. [Acedido em 14 Fevereiro 2017]. **2016**.

- Infarmed. *Seleção e Validação de Métodos de Ensaio*, s.l.: s.n. **2016**.
- Infarmed. *Ácido Bórico 4%*, s.l.: s.n. **2017**.
- Infarmed. *Hidróxido de Sódio 32%*, s.l.: s.n. **2017**.
- Instituto Português da Qualidade. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005)*, s.l.: s.n. **2005**.
- Jaggi, Neena; Vij, D.R.. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Springer, Boston, MA: Handbook of Applied Solid State Spectroscopy. **2006**.
- Kamizake, Neide K. K.; Gonçalves, Mauricio M.; Zaia, Cássia T. B. V.; Zaia, Dimas A. M.. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2003**, 16(4), 507-516.
- Lucena, José. *Espectrofotometria no ultravioleta visível*. [Online] Disponível em: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAenlsAC/espectrofotometria-no- ultravioleta-visivel> [Acedido em 3 Abril 2017]. **2011**.
- Merck Millipore. *Fast and accurate peptide quantification using the Direct Detect® spectrometer*, Germany: s.n. **2013**.
- Mieloma Múltiplo. *Tipos de Mieloma*. [Online] Disponível em: <http://www.mielomamultiplo.info/tipos-de-mieloma/> [Acedido em 20 Março 2017]. **2016**.
- Miller, James N.; Miller, Jane C.. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow: Pearson Education. **2000**.
- Muñoz-Huerta, Rafael F.; Guevara-Gonzalez, Ramon G.; Contreras-Medina, Luis M.; Torres-Pacheco, Irineo; Prado-Olivarez, Juan; Ocampo-Velazquez, Rosalia V.. A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances. *Sensors*. **2013**, 13(8), 10823-10843.
- Nacional Institute of Standards & Technology. *Certificate of Analysis Standard Reference Material*, Gaithersburg: s.n. **2016**.
- Okutucu, Burcu; Dincer, Ayse; Habib, Omer; Zihnioglu, Figen. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **2007**, 70(5), 709-711.
- Palmqvist, Eva; Hahn-Hägerdal, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. **2000**, 74(1), 17-24.

- PanReac AppliChem ITW Reagents, s.d. *Nitrogen Determination by Kjeldahl Method*. s.l.:s.n. **2012**.
- Santos, Sonia F.; Zanette, Dino; Fischer, Hannes; Itri, Rosangela. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2003**, 262(2), 400-408.
- Skoog, Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R.. *Principles of Instrumental Analysis*. 17^a ed. United States of America: Cengage Learning. **2016**.
- Smith, Brian C.. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2^a ed. United States of America: CRC Press. **2011**.
- Strug, Ivona; Utzat, Christopher; III, Amedeo Cappione; Gutierrez, Sara; Amara, Ryan; Lento, Joseph; Capito, Florian; Skudas, Romas; Chernokalskaya, Elena; Nadler, Timothy. Development of a Univariate Membrane-Based Mid-Infrared Method for Protein Quantitation and Total Lipid Content Analysis of Biological Samples. *Hindawi Publishing Corporation*. **2014**, 2014(2014), 1-12.
- Thermo Nicolet. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. s.l.:Thermo Nicolet Corporation. **2001**.
- Thermo Scientific. *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook*. s.l.:s.n. **2010**.
- Upetri, Girish C.; Wang, Yanming; Finn, Alona; Sharrock, Abigail; Feisst, Nicholas; Davy, Marcus; Jordan, Robert B.. U-2012: An improved Lowry protein assay, insensitive to sample color, offering reagent stability and enhanced sensitivity. *BioTechniques*. **2012**, 52(3), 159-166.
- Waterborg, Jakob H.. *The Lowry Method for Protein Quantitation*. s.l.:The Protein Protocols Handbook. **2002**.
- Wilson, Keith; Walker, John. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. 5^a ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. **2000**.

8 Anexo 1 - Materiais e Métodos

8.1 Preparação de Soluções

Na Tabela 11 apresenta-se as diferentes diluições utilizadas na preparação das soluções de BSA NIST para o método do Biureto, sendo que se realizou uma diluição prévia da solução inicial de BSA NIST, com uma concentração de 70 mg/mL, com 353 µL dessa solução e 647 µL de solvente, de modo a perfazer um total de 1 mL.

Tabela 11 - Diluições realizadas para as soluções de BSA NIST, para o método o Biureto.

Preparação das Soluções de BSA NIST

Solução de BSA NIST	Concentração Final de BSA NIST/ mg/mL	Volume de BSA NIST/ µL	Volume de Solvente/ µL
BSA 1	1,979	80	920
BSA 2	1,484	60	940
BSA 3	1,237	50	950
BSA 4	0,989	40	960
BSA 5	0,742	30	970

Na Tabela 12 apresenta-se as diluições prévias realizadas para cada uma das amostras de imunoglobulina, para o método do Biureto, sendo que de seguida se realizou uma diluição 1/20 com 50 µL da diluição prévia de 950 µL de solvente.

Tabela 12 - Diluições prévias realizadas para cada amostra, para o método do Biureto.

Nome Comercial	Diluição Prévia	Volume de Amostra/ μL	Volume de Solvente/ μL
Albumina Humana 20 %	1/8	100	700
Albunorm 4 %	1/1,5	400	200
Albunorm 5 %	1/2	500	500
Albunorm 20 %	1/8	100	700
Albunorm 25 %	1/10	100	900
Flebogamma DIF 5 %	1/2	500	500
Flebogamma DIF 10 %	1/4	100	300
Gammanorm	1/6	100	500
Octagam 5 %	1/2	500	500
Octagam 10 %	1/4	100	300
Rhesonativ	1/6	100	500

Na Tabela 13 apresenta-se as diferentes diluições utilizadas na preparação das soluções de BSA para o método de Lowry, sendo que se realizou uma diluição prévia da solução inicial de BSA, com uma concentração de 2 mg/mL, com 200 μL dessa solução e 1800 μL de solvente, de modo a perfazer um total de 2 mL.

Tabela 13 - Diluições realizadas para as soluções de BSA, para o método de Lowry.

Preparação das Soluções de BSA

Solução de BSA	Concentração Final de BSA/ $\mu\text{g/mL}$	Volume de BSA/ μL	Volume de Solvente/ μL
BSA 1	150	150	50
BSA 2	125	125	75
BSA 3	100	100	100
BSA 4	75	75	125
BSA 5	50	50	175

Na Tabela 14 apresenta-se as diluições prévias realizadas para cada uma das amostras, para o método de Lowry.

Tabela 14 - Diluições prévias realizadas para cada amostra, para o método de Lowry.

Nome Comercial	Diluição Prévia	Volume de Amostra/ μL	Volume de Solvente/ μL
Albumina Humana 20 %	1/1000	10	9990
Gammanorm	1/1000	10	9990
Octagam 5 %	1/100	50	4950
Octagam 10 %	1/1000	10	9990

Na Tabela 15 apresenta-se as diluições realizadas para cada uma das amostras de imunoglobulina, para o método de Lowry, sendo que de seguida se pipetou 200 μL dessas amostras.

Tabela 15 - Diluições realizadas para cada amostra, para o método de Lowry.

Nome Comercial	Diluição	Volume de Amostra/ μL	Volume de Solvente/ μL
Albumina Humana 20 %	1/2	400	400
Gammanorm	1/1,65	400	330
Octagam 5 %	1/5	200	800

Na Tabela 16 apresenta-se as diluições realizadas para o padrão e para cada amostra em análise, para a Absortividade Molar, de modo a obter um volume final de 2 mL.

Tabela 16 - Diluições realizadas para o padrão e para cada amostra, para a Absortividade Molar.

Nome Comercial	Diluição	Volume de Amostra/ μL	Volume de Solvente/ μL
BSA NIST	1/67	30	1970
Flebogamma DIF 5 %	1/50	40	1960
Flebogamma DIF 10 %	1/100	20	1980
Octagam 5 %	1/50	40	1960
Octagam 10 %	1/100	20	1980

9 Anexo 2 - Resultados e Discussão

O desvio padrão (s) para cada solução foi calculado através da **Equação (9.1)**, onde x_i corresponde ao valor do ensaio, \bar{x} corresponde ao valor médio dos ensaios e n corresponde ao número de ensaios.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (9.1)$$

O coeficiente de variação (CV) para cada solução foi calculado através da **Equação (9.2)**, sendo que este valor deveria ser igual ou inferior a 10%.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (9.2)$$

9.1 Método de Kjeldahl

Na **Tabela 17** apresenta-se os valores médios dos duplicados, em cada ensaio, para os ensaios de validação, para o método de Kjeldahl.

Tabela 17 - Resultados obtidos para os ensaios de validação, para o método de Kjeldahl.

Amostra	Ensaio	Resultado Final
L-Fenilalanina	1	8,391 %
	2	8,502 %
	3	8,147 %
	4	8,538 %
	Média (\bar{x})	8,394 %
	s	0,176
	CV/ %	2,101
BSA NIST	1	71,743 g/L
	2	71,166 g/L
	3	68,105 g/L
	4	70,280 g/L

	Média (\bar{x})	70,323 g/L
	<i>s</i>	1,597
	CV/ %	2,271
Octagam 5 %	1	51,506 g/L
	2	51,430 g/L
	3	49,723 g/L
	Média (\bar{x})	50,886 g/L
	<i>s</i>	1,008
	CV/ %	1,981

Na **Tabela 18** apresenta-se os valores médios dos duplicados, em cada ensaio, para as amostras analisadas para o método de Kjeldahl.

Tabela 18 - Resultados obtidos para as amostras analisadas, para o método de Kjeldahl.

Amostra	Ensaio	Resultado Final
L-Fenilalanina	1	8,547 %
	2	8,445 %
	3	8,453 %
	Média (\bar{x})	8,482 %
	<i>s</i>	0,057
	CV/ %	0,669
Flebogamma DIF 5 %	1	50,245 g/L
	2	49,859 g/L
	3	49,172 g/L
	Média (\bar{x})	49,759 g/L
	<i>s</i>	0,543
	CV/ %	1,092

Flebogamma DIF 10 %	1	100,684 g/L
	2	100,561 g/L
	3	99,347 g/L
	Média (\bar{x})	100,197 g/L
	<i>s</i>	0,739
	CV/ %	0,738
Octagam 5 %	1	52,401 g/L
	2	51,451 g/L
	3	50,844 g/L
	Média (\bar{x})	51,565 g/L
	<i>s</i>	0,785
	CV/ %	1,522
Octagam 10 %	1	100,455 g/L
	2	98,591 g/L
	3	98,256 g/L
	Média (\bar{x})	99,101 g/L
	<i>s</i>	1,185
	CV/ %	1,196

9.2 Método do Biureto

Na Tabela 19 apresenta-se os valores médios de absorvância obtidos para cada um dos 3 ensaios da reta de calibração de MRI-d, tendo como amostra a BSA NIST, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor para a BSA NIST variam entre 69,58 mg/mL \pm 1,30 mg/mL (68,28 - 70,88 mg/mL).

Tabela 19 - Valores obtidos para a reta de calibração de MRI-d e para a amostra de BSA NIST, para o método do Biureto.

Solução	Concentração/ mg/mL	Absorvância					
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média (\bar{x})	<i>s</i>	CV/ %
MRI-d1	1,979	0,279	0,273	0,272	0,275	0,004	1,4
MRI-d2	1,484	0,209	0,207	0,205	0,207	0,002	1,0
MRI-d3	1,237	0,176	0,171	0,172	0,173	0,003	1,5
MRI-d4	0,989	0,141	0,136	0,139	0,139	0,003	1,8
MRI-d5	0,742	0,105	0,101	0,103	0,103	0,002	1,9
Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL		Absorvância		Resultado Final/ mg/mL	
BSA NIST	1	1,154		0,164		69,24	
	2	1,143		0,158		68,58	
	3	1,166		0,162		69,96	
	Média (\bar{x})	1,154		0,161		69,26	
	<i>s</i>	0,012		0,003		0,690	
	CV/ %	1,0		1,9		1,0	

Na Tabela 20 apresenta-se os valores médios de absorvância obtidos para cada um dos 3 ensaios da reta de calibração de BSA NIST, tendo como amostra o MRI-d, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor para o MRI-d variam entre 4,5 - 5,5 % (m/v).

Tabela 20 - Valores obtidos para a reta de calibração de BSA e para a amostra de MRI-d, para o método do Biureto.

Solução	Concentração/ mg/mL	Absorvância					
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média (\bar{x})	<i>s</i>	CV/ %
BSA 1	1,979	0,258	0,255	0,254	0,256	0,002	0,8
BSA 2	1,484	0,192	0,190	0,190	0,191	0,001	0,6
BSA 3	1,237	0,157	0,156	0,158	0,157	0,001	0,6
BSA 4	0,989	0,123	0,124	0,124	0,124	0,001	0,5
BSA 5	0,742	0,090	0,094	0,090	0,091	0,002	2,5
Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL		Absorvância		Resultado Final/ % (m/v)	
MRI-d	1	1,356		0,173		5,4	
	2	1,366		0,174		5,5	
	3	1,349		0,172		5,4	
	Média (\bar{x})	1,357		0,173		5,4	
	<i>s</i>	0,009		0,001		0,058	
	CV/ %	0,6		0,6		1,1	

Na Tabela 21 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Albumina Humana 20 %, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 19,0 - 21,0 % (m/v).

Tabela 21 - Resultados obtidos para Albumina Humana 20 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,370	0,174	21,9
	2	1,349	0,170	21,6
	3	1,370	0,173	21,9
	Média (\bar{x})	1,363	0,172	21,8
	<i>s</i>	0,012	0,002	0,173
	CV/ %	0,9	1,2	0,8
2	1	1,369	0,174	21,9
	2	1,356	0,171	21,7
	3	1,376	0,174	22,0
	Média (\bar{x})	1,367	0,173	21,9
	<i>s</i>	0,010	0,002	0,153
	CV/ %	0,7	1,0	0,7
3	1	1,365	0,174	21,8
	2	1,339	0,169	21,4
	3	1,362	0,172	21,8
	Média (\bar{x})	1,355	0,172	21,7
	<i>s</i>	0,014	0,003	0,231
	CV/ %	1,0	1,5	1,1

Na Tabela 22 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Alunorm 4 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 3,8 - 4,2 % (m/v).

Tabela 22 - Resultados obtidos para Alunorm 4 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,415	0,181	4,2
	2	1,418	0,181	4,3
	3	1,418	0,181	4,3
	Média (\bar{x})	1,417	0,181	4,3
	<i>s</i>	0,002	0,000	0,058
	CV/ %	0,1	0,0	1,4
2	1	1,433	0,183	4,3
	2	1,415	0,181	4,2
	3	1,431	0,183	4,3
	Média (\bar{x})	1,426	0,182	4,3
	<i>s</i>	0,010	0,001	0,058
	CV/ %	0,7	0,6	1,4
3	1	1,422	0,182	4,3
	2	1,425	0,182	4,3
	3	1,430	0,183	4,3
	Média (\bar{x})	1,426	0,182	4,3
	<i>s</i>	0,004	0,001	0,000
	CV/ %	0,3	0,3	0,0

Na Tabela 23 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Alunorm 5 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 4,75 - 5,25 % (m/v).

Tabela 23 - Resultados obtidos para Alburnorm 5 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,318	0,168	5,27
	2	1,354	0,172	5,42
	3	1,299	0,168	5,20
	Média (\bar{x})	1,324	0,169	5,30
	<i>s</i>	0,028	0,002	0,112
	CV/ %	2,1	1,4	2,1
2	1	1,309	0,167	5,24
	2	1,347	0,172	5,39
	3	1,311	0,170	5,24
	Média (\bar{x})	1,322	0,170	5,29
	<i>s</i>	0,021	0,003	0,087
	CV/ %	1,6	1,5	1,6
3	1	1,336	0,171	5,34
	2	1,325	0,169	5,30
	3	1,329	0,172	5,32
	Média (\bar{x})	1,330	0,171	5,32
	<i>s</i>	0,006	0,002	0,020
	CV/ %	0,4	0,9	0,4

Na Tabela 24 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Alburnorm 20 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 19,0 - 21,0 % (m/v).

Tabela 24 - Resultados obtidos para Alburnorm 20 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,301	0,167	20,8
	2	1,280	0,164	20,5
	3	1,312	0,166	21,0
	Média (\bar{x})	1,298	0,166	20,8
	<i>s</i>	0,016	0,002	0,252
	CV/ %	1,3	0,9	1,2
2	1	1,314	0,169	21,0
	2	1,301	0,166	20,8
	3	1,333	0,168	21,3
	Média (\bar{x})	1,316	0,168	21,0
	<i>s</i>	0,016	0,002	0,252
	CV/ %	1,2	0,9	1,2
3	1	1,294	0,166	20,7
	2	1,330	0,170	21,3
	3	1,335	0,169	21,4
	Média (\bar{x})	1,320	0,168	21,1
	<i>s</i>	0,022	0,002	0,379
	CV/ %	1,7	1,2	1,8

Na Tabela 25 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Alburnorm 25 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 23,8 - 26,2 % (m/v).

Tabela 25 - Resultados obtidos para Alburnorm 25 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,347	0,170	26,9
	2	1,357	0,172	27,1
	3	1,323	0,170	26,5
	Média (\bar{x})	1,342	0,171	26,8
	<i>s</i>	0,017	0,001	0,306
	CV/ %	1,3	0,7	1,1
2	1	1,353	0,171	27,1
	2	1,333	0,169	26,7
	3	1,334	0,171	26,7
	Média (\bar{x})	1,340	0,170	26,8
	<i>s</i>	0,011	0,001	0,231
	CV/ %	0,8	0,7	0,9
3	1	1,371	0,173	27,4
	2	1,396	0,177	27,9
	3	1,330	0,171	26,6
	Média (\bar{x})	1,366	0,174	27,3
	<i>s</i>	0,033	0,003	0,656
	CV/ %	2,4	1,8	2,4

Na Tabela 26 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Flebogamma DIF 5 %, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 45 - 55 mg/mL.

Tabela 26 - Resultados obtidos para Flebogamma DIF 5 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ mg/mL
1	1	1,354	0,173	54
	2	1,353	0,174	54
	3	1,356	0,172	54
	Média (\bar{x})	1,354	0,173	54
	<i>s</i>	0,002	0,001	0,000
	CV/ %	0,1	0,6	0,0
2	1	1,381	0,176	55
	2	1,370	0,176	55
	3	1,394	0,177	56
	Média (\bar{x})	1,382	0,176	55
	<i>s</i>	0,012	0,001	0,577
	CV/ %	0,9	0,3	1,0

Na Tabela 27 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Flebogamma DIF 10 %, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 90 - 110 mg/mL.

Tabela 27 - Resultados obtidos para Flebogamma DIF 10 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ mg/mL
1	1	1,318	0,169	105
	2	1,340	0,172	107
	3	1,354	0,172	108
	Média (\bar{x})	1,337	0,171	107
	<i>s</i>	0,018	0,002	1,528
	CV/ %	1,4	1,0	1,4
2	1	1,331	0,171	106
	2	1,358	0,175	109
	3	1,371	0,174	110
	Média (\bar{x})	1,353	0,173	108
	<i>s</i>	0,020	0,002	2,082
	CV/ %	1,5	1,2	1,9

Na Tabela 28 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Gammanorm, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 149 - 182 mg/mL.

Tabela 28 - Resultados obtidos para Gammanorm, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ mg/mL
1	1	1,438	0,184	173
	2	1,451	0,192	174
	3	1,484	0,188	178
	Média (\bar{x})	1,458	0,188	175
	<i>s</i>	0,024	0,004	2,646
	CV/ %	1,6	2,1	1,5
2	1	1,449	0,185	174
	2	1,418	0,188	170
	3	1,464	0,186	178
	Média (\bar{x})	1,444	0,186	174
	<i>s</i>	0,023	0,002	4,000
	CV/ %	1,6	0,8	2,3
3	1	1,424	0,182	171
	2	1,386	0,183	166
	3	1,444	0,183	173
	Média (\bar{x})	1,418	0,183	170
	<i>s</i>	0,029	0,001	3,606
	CV/ %	2,1	0,3	2,1

Na Tabela 29 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Octagam 5 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 4,5 - 5,5 % (m/v).

Tabela 29 - Resultados obtidos para Octagam 5 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,365	0,173	5,5
	2	1,365	0,175	5,4
	3	1,380	0,173	5,5
	Média (\bar{x})	1,370	0,174	5,5
	<i>s</i>	0,009	0,001	0,058
	CV/ %	0,6	0,7	1,1
2	1	1,389	0,176	5,5
	2	1,383	0,177	5,5
	3	1,395	0,175	5,6
	Média (\bar{x})	1,389	0,176	5,5
	<i>s</i>	0,006	0,001	0,058
	CV/ %	0,4	0,6	1,0
3	1	1,387	0,176	5,5
	2	1,377	0,176	5,5
	3	1,381	0,174	5,5
	Média (\bar{x})	1,382	0,175	5,5
	<i>s</i>	0,005	0,001	0,000
	CV/ %	0,4	0,7	0,0

Na Tabela 30 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Octagam 10 %, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 9,0 - 11,0 % (m/v).

Tabela 30 - Resultados obtidos para Octagam 10 %, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	1,329	0,169	10,6
	2	1,309	0,169	10,5
	3	1,348	0,171	10,8
	Média (\bar{x})	1,329	0,170	10,6
	<i>s</i>	0,020	0,001	0,153
	CV/ %	1,5	0,7	1,4
2	1	1,360	0,173	10,9
	2	1,350	0,174	10,8
	3	1,366	0,173	10,9
	Média (\bar{x})	1,359	0,173	10,9
	<i>s</i>	0,008	0,001	0,058
	CV/ %	0,6	0,3	0,5
3	1	1,339	0,171	10,7
	2	1,324	0,171	10,6
	3	1,363	0,173	10,9
	Média (\bar{x})	1,342	0,172	10,7
	<i>s</i>	0,020	0,001	0,153
	CV/ %	1,5	0,7	1,4

Na Tabela 31 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Rhesonativ, bem como o respetivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 149 - 182 mg/mL.

Tabela 31 - Resultados obtidos para Rhesonativ, para o método do Biureto.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ mg/mL
1	1	1,380	0,169	166
	2	1,463	0,188	176
	3	1,498	0,191	180
	Média (\bar{x})	1,447	0,183	174
	<i>s</i>	0,061	0,012	7,211
	CV/ %	4,2	6,5	4,1
2	1	1,466	0,180	176
	2	1,458	0,188	175
	3	1,470	0,187	176
	Média (\bar{x})	1,465	0,185	176
	<i>s</i>	0,006	0,004	0,577
	CV/ %	0,4	2,4	0,3
3	1	1,427	0,176	171
	2	1,438	0,185	173
	3	1,474	0,188	177
	Média (\bar{x})	1,446	0,183	174
	<i>s</i>	0,025	0,006	3,055
	CV/ %	1,7	3,4	1,8

9.3 Método de Lowry

Na Tabela 32 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Albumina Humana 20 %, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 19,0 - 21,0 % (m/v).

Tabela 32 - Resultados obtidos para Albumina Humana 20 %, para o método de Lowry.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
Albumina Humana 20%	1	0,094	0,240	18,8
	2	0,094	0,224	18,8
	3	0,103	0,236	20,6
	Média (\bar{x})	0,097	0,233	19,4
	s	0,005	0,008	1,039
	CV/ %	5,4	3,6	5,4

Na Tabela 33 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Gammanorm, bem como o respectivo desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 149 - 182 mg/mL.

Tabela 33 - Resultados obtidos para Gammanorm, para o método de Lowry.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ mg/mL
Gammanorm	1	0,132	0,307	218
	2	0,130	0,316	215
	3	0,132	0,299	218
	Média (\bar{x})	0,131	0,307	217
	s	0,001	0,009	1,732
	CV/ %	0,9	2,8	0,8

Na Tabela 34 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Octagam 5 %, bem como o respectivo desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 4,5 - 5,5 % (m/v).

Tabela 34 - Resultados obtidos para Octagam 5 %, para o método de Lowry.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	0,132	0,309	6,6
	2	0,138	0,322	6,9
	3	0,129	0,294	6,5
	Média (\bar{x})	0,133	0,308	6,7
	<i>s</i>	0,005	0,014	0,208
	CV/ %	3,4	4,5	3,1
2	1	0,135	0,314	6,8
	2	0,135	0,314	6,8
	3	0,143	0,321	7,2
	Média (\bar{x})	0,138	0,316	6,9
	<i>s</i>	0,005	0,004	0,231
	CV/ %	3,4	1,3	3,3
3	1	0,136	0,321	6,8
	2	0,138	0,320	6,9
	3	0,136	0,315	6,8
	4	0,132	0,308	6,6
	5	0,135	0,315	6,8
	6	0,138	0,311	6,9
	Média (\bar{x})	0,136	0,315	6,8
	<i>s</i>	0,002	0,005	0,110
CV/ %	1,6	1,6	1,6	

Na Tabela 35 apresenta-se os valores médios de concentração, absorvância e resultado final obtidos para cada um dos 3 ensaios de Octagam 10 %, bem como o respectivo desvio padrão (*s*) e coeficiente de variação (CV). De notar que os valores de especificação fornecidos pelo produtor variam entre 9,0 - 11,0 % (m/v).

Tabela 35 - Resultados obtidos para Octagam 10 %, para o método de Lowry.

Amostra	Ensaio	Concentração/ mg/mL	Absorvância	Resultado Final/ % (m/v)
1	1	0,131	0,307	13,1
	2	0,138	0,322	13,8
	3	0,137	0,311	13,7
	Média (\bar{x})	0,135	0,313	13,5
	<i>s</i>	0,004	0,008	0,379
	CV/ %	2,8	2,5	2,8
2	1	0,138	0,322	13,8
	2	0,136	0,317	13,6
	3	0,146	0,327	14,6
	Média (\bar{x})	0,140	0,322	14,0
	<i>s</i>	0,005	0,005	0,529
	CV/ %	3,8	1,6	3,8
3	1	0,126	0,296	12,6
	2	0,133	0,311	13,3
	3	0,142	0,320	14,2
	Média (\bar{x})	0,134	0,309	13,4
	<i>s</i>	0,008	0,012	0,802
	CV/ %	6,0	3,9	6,0