



Vigilância Sanitária em Debate

ISSN: 2317-269X

INCQS-FIOCRUZ

Andrade, Sinéa Mendes de; Silva, Manuela da; Silva, Filipe Soares Quirino da
Análise de interferon humano recombinante presente em formulações farmacêuticas
Vigilância Sanitária em Debate, vol. 5, núm. 3, 2017, Julho-Setembro, pp. 66-75
INCQS-FIOCRUZ

DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00943>

Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=570562913010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em redalyc.org

UABM redalyc.org

Sistema de Informação Científica Redalyc
Rede de Revistas Científicas da América Latina e do Caribe, Espanha e Portugal
Sem fins lucrativos acadêmica projeto, desenvolvido no âmbito da iniciativa
acesso aberto

Análise de interferon humano recombinante presente em formulações farmacêuticas

Recombinant human interferon analysis in pharmaceutical formulations

Sinéa Mendes de Andrade^{1,*}

Manuela da Silva^{II}

Filipe Soares Quirino da Silva^I

RESUMO

Introdução: Em virtude do interesse para o tratamento da hepatite, o processo de produção industrial do INF- α foi desenvolvido e aperfeiçoado ao longo dos últimos anos. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para caracterizar a estrutura molecular do INF- α 2b em formulações farmacêuticas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. **Método:** Inicialmente foi desenvolvido um método de cromatografia líquida baseado em fase reversa para promover a separação entre o INF- α 2b constituinte ativo e minoritário e a soro albumina humana, também componente presente nas formulações farmacêuticas, obtendo-se amostras com homogeneidade proteica, revelada por eletroforese. As amostras em solução foram submetidas à digestão com tripsina, levadas ao espectrômetro de massa MALDI-TOF. Para que fosse analisada a estrutura molecular, foi desenvolvido um procedimento baseado em imunoafinidade e cromatografia de gel filtração. **Resultados:** As amostras preparadas por estes métodos apresentaram homogeneidade proteica por eletroforese, sendo analisadas por dicróismo circular e fluorescência, o que demonstrou ter degradação da estrutura tridimensional. **Conclusões:** Esse trabalho fornece dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- α 2b em produto final, que poderia substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de resultar em um maior número de informações sobre a estrutura molecular do biofármaco.

PALAVRAS-CHAVE: Interferon-alfa; Proteínas; MALDI-TOF; Dicroísmo Circular; Fluorescência

ABSTRACT

Introduction: Due to the interest in the treatment of hepatitis, the industrial production process of INF- α has been developed and perfected over the last few years. **Objective:** The present work aimed to develop a protocol to characterize the molecular structure of INF- α 2b in pharmaceutical formulations by MALDI-TOF mass spectrometry. **Method:** Initially, a reversed-phase liquid chromatography method was developed to promote the separation of active and minor constituent INF- α 2b and human serum albumin, also present in the pharmaceutical formulations, to obtain samples with protein homogeneity revealed by electrophoresis. Samples were hydrolyzed with trypsin and submitted to MALDI-TOF. In order to analyze the molecular structure, a procedure based on immunoaffinity and gel filtration chromatography was developed. **Results:** Prepared samples by these methods showed protein homogeneity by SDS-PAGE, and were analyzed by circular dichroism and fluorescence, which showed three-dimensional structure degradation. **Conclusions:** This work provides important data that support the establishment of a protocol for the analysis of INF- α 2b in final product, which could replace the traditional peptide mapping by liquid chromatography, with the advantage of resulting in a larger amount of information about the structure of the biopharmaceutical.

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*E-mail: sinea.mendes@incqs.fiocruz.br

Recebido: 03 mar 2017

Aprovado: 11 ago 2017

KEYWORDS: Alpha Interferon; Protein; MALDI-TOF; Circular Dichroism; Fluorescence



INTRODUÇÃO

A infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B atinge cerca de 240 milhões de pessoas mundialmente, sendo a principal causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que 686.000 pessoas venham a morrer por ano em consequência da hepatite B crônica ou aguda¹. O controle dessa doença envolve a vacinação de forma preventiva e o uso de antivirais, nos indivíduos infectados. Os medicamentos preconizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAVH), nesse caso, são interferon-alfa (INF α), interferon-alfa peguilado, lamivudina, tenofovir, entecavir e adefovir².

Os interferons são um grupo de proteínas da família das citocinas, produzidas pelo organismo como resposta a infecções virais, sendo classificados de acordo com suas sequências em tipo I, famílias α , β , ϵ , κ , ω , e ϑ , como exemplo. No caso das hepatites virais foi identificada a importância do INF- α como um fator que impede a replicação viral, contribuindo para o tratamento dessa doença^{3,4,5,6}.

Em virtude do interesse para o tratamento da hepatite, o processo de produção industrial do INF- α foi desenvolvido e aperfeiçoado ao longo dos últimos anos. Em linhas gerais, o INF- α é produzido por superexpressão em células de *Escherichia coli*. Após a superexpressão, o INF- α é purificado utilizando-se combinação de vários métodos cromatográficos⁷.

Devido a sua estrutura proteica, o INF- α não é ativo por via oral. Por isso, os produtos acabados a granel devem ser convertidos em uma fórmula adequada para administração por via injetável. Além das propriedades inerentes a produtos injetáveis, como pH, isotonicidade, apirogenicidade e presença de agentes antioxidantes, esta formulação deve garantir a estabilidade do INF durante seu prazo de validade⁸. O excipiente mais utilizado é soro albumina humana (SAH), tendo como função principal estabilizar o produto, impedindo a agregação das moléculas, evitando a perda da potência e a formação de anticorpos contra o biofármaco^{9,10}.

A formulação básica de INF- α contém 1,5 mg de SAH por mL. Como a relação entre massa e atividade é de $1,4 \times 10^8$ UI/mg¹¹, dependendo da apresentação, cada mL de formulação contém uma determinada massa de INF- α . Na menor dose, conforme descrito na bula dos produtos, a formulação tem cerca de 20 μ g de INF- α e 1,5 mg de SAH. Pode-se observar que a menor razão molar é de 1 de INF- α para 24 da composição proteica final.

O controle de qualidade dos INF pode ser feito utilizando dois grupos de ensaios. O primeiro grupo, que abrange ensaios comuns a formas farmacêuticas líquidas para uso interno (injetável), é constituído por testes de volume médio, pH, inocuidade, esterilidade e endotoxinas bacterianas. Quando o produto final é apresentado como liofilizado, deve ser avaliada a umidade residual, importante para a estabilidade do produto¹².

O segundo grupo de ensaios diz respeito às particularidades do INF- α quanto à natureza proteica do biofármaco. Esses ensaios variam de acordo com as monografias para o INF- α em cada farmacopeia. No Brasil, a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (FB) não

inclui monografia específica para INF- α . A FB também não apresenta recomendações gerais para produtos produzidos por DNA recombinante, diferentemente das farmacopeias internacionais¹³.

A *United States Pharmacopoeia* 39 (USP-39) não apresenta uma monografia específica para o INF- α . Por outro lado, a USP-39 recomenda uma série de requisitos que devem ser avaliados para caracterização de artigos derivados de biotecnologia e sugere métodos para essa avaliação, tais como análise de aminoácidos, eletroforese capilar, eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaio de proteínas totais. Vale notar que há indicações específicas sobre os ensaios aplicáveis a etapas intermediárias e ao produto final, ficando a critério do fabricante fazer avaliações durante ou no término do processo¹⁴.

Como a USP-39, a Farmacopeia Europeia 8.0. ed. (FE)¹¹ também prescreve requisitos gerais para produtos de biotecnologia DNA recombinantes. A FE determina que o produto deva ser caracterizado quanto a sua identidade, pureza, potência e estabilidade, utilizando métodos químicos, físicos, imunoquímicos e biológicos. Nenhum ensaio específico é apontado. Algumas metodologias são sugeridas para determinar a consistência de produção. Essas metodologias envolvem caracterizar a composição de aminoácidos, o sequenciamento da região N terminal, o mapa de peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Fase Reversa (CLAE-FR), o teor de proteína total e de proteínas contaminantes provenientes do sistema de expressão.

No final das recomendações gerais, a FE determina que nas monografias específicas sejam listados os ensaios aplicáveis a cada produto. A FE tem uma monografia específica para avaliar a matéria prima do INF- α antes do biomedicamento ser formulado. Essa monografia recomenda os seguintes ensaios:

- Mapa de peptídeos CLAE-FR - método de identificação da proteína por comparação entre cromatogramas de INF- α padrão e da amostra. Ambos, padrão e amostra, submetidos previamente a hidrólise com tripsina;
- Focalização isoeletrica - identifica degradações que alteram o ponto isoeletrico (pI) da proteína INF- α ;
- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) - conformidade com a massa molecular esperada em relação ao padrão e homogeneidade da proteína;
- Teor de proteínas;
- Proteínas relacionadas - são produtos de degradação do INF. Estas impurezas estão intrinsecamente relacionadas ao princípio ativo proteico. São agregados, formas oxidadas e produtos de hidrólise e;
- Potência - determinada pela medida de seu efeito de proteção celular contra o efeito citopático viral em células MDBK induzido pelo vírus da estomatite vesicular. A potência é comparada a uma preparação de padrão internacional, cujo resultado relaciona o produto à especificação, expresso em termos de unidades internacionais por miligrama de proteína.



As metodologias relacionadas fornecem informações quanto à pureza, identidade e potência do INF- α e estão classicamente colocadas como parâmetros de avaliação de alterações que podem implicar na ausência de eficácia, e/ou ainda na imunogenicidade do produto¹¹.

O mapa de peptídeos por CLAE-FR é uma técnica de identidade que demanda essencialmente uma comparação entre hidrolisados de um padrão do INF- α e da amostra. Trata-se também de uma técnica demorada, pois há a necessidade do uso de gradiente, o que leva a análises de até duas horas de duração para cada amostra¹¹.

A ausência de monografias para produto acabado nas farmacopeias dificulta as autoridades regulatórias em relação à exigência mínima de qualidade para esse tipo de produto^{11,12,13}.

O efeito farmacológico das proteínas está relacionado à sua complexa estrutura molecular. Falhas na expressão da proteína, com modificações da estrutura primária e a desnaturação da estrutura tridimensional, por exemplo, podem levar a uma redução da afinidade aos receptores, diminuindo ou mesmo eliminando o efeito farmacológico. A degradação física, como perda da estrutura secundária e terciária, compromete a capacidade de ligação do INF- α ao receptor, comprometendo o seu efeito^{15,16,17}. Por esse motivo, o desenvolvimento de métodos para avaliação do produto final é relevante, principalmente pela possibilidade de incorporação de metodologias mais novas, que avaliem detalhadamente a estrutura molecular do biofármaco.

Métodos espectroscópicos podem ser usados para avaliar o teor de proteína na preparação e fornecer informações sobre a estrutura molecular. A identidade pode ser determinada por espectrometria de massa e a estabilidade da estrutura tridimensional por dicroísmo circular e fluorescência¹⁸.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de buscar metodologias analíticas mais modernas e eficientes para o controle de qualidade do INF- α em formulações farmacêuticas, de maneira a se obter informação acerca da segurança, qualidade e eficácia do biofármaco que deem suporte para as ações de Vigilância Sanitária.

MÉTODO

Amostras

Utilizaram-se amostras de INF- α 2b de um produtor nacional, adquiridas pela Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, para o Programa Nacional de Controle de Hepatites Virais. Foram analisados lotes de formulação com potência de 10×10^6 UI/mL/frasco.

Reagentes

Todas as soluções neste estudo foram preparadas com água ultrapura usando o sistema Milli-Q® (Millipore). Os reagentes foram fornecidos pela Sigma, GE, Bio-Rad e Merck, dentre outros. Os reagentes específicos a determinadas técnicas foram relacionados conforme

descrição dos procedimentos. O padrão de INF- α 2b Lote nº 3 utilizado foi fornecido pela Farmacoepia Europeia.

Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

A CLAE-FR foi utilizada para separar o INF- α 2b da SAH e dos demais componentes da formulação. O experimento foi realizado no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10 (Shimadzu), equipado com sistema controlador SCL-10A_{vp}, bomba LC-10 AD_{vp}, válvula seletora de solvente Shimadzu FCV-10AL, auto injetor SIL-10AD_{vp}, resfriador de amostra, coletor de frações FRC-10A, e detector UV/VIS SPD 10A. A coluna utilizada foi ACE 3 C18-300 (250 mm x 4,6 mm), mantida em temperatura ambiente. A fase móvel A consistiu de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%) em água, fase móvel B de acetonitrila (ACN): TFA 0,1%, com gradiente descrito na FE¹⁹; fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de detecção 214 nm. Os dados foram processados utilizando Class - VP 6.13 SP2. O volume de injeção foi de 100 μ L.

Digestão enzimática

A solução de tripsina (Promega V5228A) foi preparada dissolvendo 100 μ g em 100 μ L de ácido acético 50 mM (solução estoque 1,0 μ g/ μ L). Desta solução estoque, foram tomados 14 μ L e diluídos em 1 mL de bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 50 mM, para o preparo de uma solução de trabalho de tripsina. Foi preparado um branco, com o tampão e demais reagentes e um padrão de INF- α 2b na concentração de 7 μ g/mL em tampão NH₄HCO₃ pH 8,4. Esta concentração é a esperada para a amostra. As frações coletadas da CLAE-FR foram liofilizadas, e, posteriormente, adicionados 100 μ L de tampão NH₄HCO₃ pH 8,4, homogeneizados em vórtex, acrescidos de 10 μ L da solução de trabalho de tripsina. As amostras permaneceram em Thermomixer®, com agitação a 37°C por 18 h. Na segunda etapa de digestão foram adicionados aos tubos mais 10 μ L da solução de trabalho de tripsina, com período de 4 horas em Thermomixer®, com agitação e temperatura de 37°C. A seguir amostra, padrão e branco foram submetidos ao procedimento de digestão^{20,21}.

Os tubos com os peptídeos foram guardados a -20°C para posterior análise por espectrometria de massa.

Espectrometria de massa (EM)

Para a identificação das amostras coletadas na CLAE-FR, foi utilizada a técnica *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), com a espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI-TOF)²².

A matriz utilizada no preparo das amostras foi ácido a-ciano-p-hidroxicinâmico (ACHC). Foi preparada uma solução saturada dessa matriz em água, ACN (1:2) e TFA (0,2%). Essa solução foi misturada com solução dos peptídeos em partes iguais, de modo a ter a relação de 1.000 a 10.000 vezes mais moléculas de matriz que moléculas de peptídeo. À alíquota de 5 μ L da amostra previamente submetida à digestão, adicionou-se 5 μ L da matriz. Aplicou-se 0,5 μ L dessa mistura em um porta-amostras, que, após a secagem, se cristalizou²².



Para a aquisição dos espectros, o espectrômetro foi operado no modo refletido, com detecção para íons positivos. A calibração do equipamento foi feita com kit de peptídeos padrões da Brucker Daltonics. Os espectros foram processados no programa XACQ 4.0²³.

Cromatografia líquida de alta eficiência de filtração em gel (CLAE-FG)

Esse experimento foi realizado no mesmo cromatógrafo utilizado na CLAE-FR. As condições específicas foram: a coluna Superdex® 75 GL (GE Healthcare) com a fase móvel tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol, fluxo: 0,4 mL/min, comprimento de onda de 214 nm, volume de 100 µL. A fração correspondente ao INF-α2b foi coletada manualmente e concentrada em Speed-Vac®^{24,25}.

Determinação quantitativa de proteínas

A determinação quantitativa de proteínas foi usada para acompanhar o teor nas frações coletadas dos métodos cromatográficos, que foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o protocolo para determinação em microplacas²⁶.

Eletroforese de proteínas com dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi usado para avaliar a homogeneidade proteica das frações coletadas dos procedimentos utilizando CLAE-FG e FR. Aliquotas de 10 mL das frações coletadas de CLAE-FG, adicionadas de 10 mL de solução de β-mercaptoetanol, foram aplicadas em gel concentrador de 5% e gel de acrilamida 15%, segundo Laemmli²⁷, e colocadas no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad), nas condições de corrida previstas em protocolo do fabricante. A coloração pela prata foi aplicada para evidenciar as bandas do INF-α2b²⁸. Os géis obtidos foram digitalizados no densitômetro GS-800 Bio-Rad, com o auxílio do programa *Quantity One* (Bio-Rad). As massas moleculares de cada banda foram estimados comparativamente a padrões de baixa massa moleculares.

Uso de membrana de imunoafinidade para remoção de SAH das amostras

Procedimento com membrana de imunoafinidade foi empregado para diminuir a quantidade de SAH para facilitar a separação cromatográfica do INF-α2b da SAH. Foi seguido o protocolo do fabricante²⁹.

Espectroscopia de dicroísmo circular

A metodologia de espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar a estrutura secundária do INF-α2b a partir da purificação por imunoafinidade/gel filtração³⁰. As frações coletadas de CLAE-FG, concentradas em *Speed-Vac*®, foram submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de *cut off* 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4³¹. Um padrão de INF-α2a da FE foi diluído com o tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, de maneira a obter concentração semelhante à da fração coletada. Os espectros foram obtidos no espectrômetro Jasco em células de quartzo de 1 cm.

Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a estrutura terciária das frações coletadas de CLAE-FG. Estas frações coletadas foram concentradas em *Speed-Vac*®, submetidas ao procedimento de diálise, utilizando membrana de *cut off* 10 kDa, contra tampão fosfato 10 mM, pH 7.4. Os espectros foram obtidos pelo espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC, em células de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico, utilizando comprimentos de onda para excitação de 280 nm e 295 nm, com tamanho da fenda de 5,0 nm. A emissão foi lida de 200 nm até 400 nm. A leitura do tampão fosfato foi subtraída como branco³².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Separação do INF-α2b dos demais componentes da formulação por CLAE-FR

A CLAE-FR é uma técnica bastante utilizada na separação de proteínas, devido a sua elevada resolução. Nesse estudo foi possível separar o INF-α2b da SAH com uma boa resolução (7,3), conforme mostrado na Figura 1(a), do perfil cromatográfico obtido da formulação de INF-α2b. O pico cromatográfico referente à SAH, presente em excesso na amostra, apresentou tempo de retenção de 58,1 min. O segundo pico, identificado como INF-α2b, apresenta tempo de retenção de 66,8 min, o que foi confirmado pela injeção do padrão da FE conforme mostrado na Figura 1(b). A CLAE-FR se mostrou eficiente para a separação INF-α2b/SAH. A hidrofobicidade do INF-α2b é superior à da SAH, como pode ser constatado nos cromatogramas da Figura 1(a) e (b), o que facilitou bastante a separação.

A homogeneidade proteica do pico de 66,8 min foi avaliada por SDS-PAGE das frações coletadas da CLAE-FR, apresentada na Figura 1(c). Foi observada uma banda com 19 kDa, que corresponde ao peso molecular do INF-α2b. Além disso, há existência de bandas de pesos moleculares maiores do que o INF-α2b, com 57 kDa. Na literatura, essas bandas são relacionadas a trimeros do INF-α2b^{33,34}. Esse resultado comprovou que o INF-α2b se apresentava numa pureza adequada à caracterização por espectroscopia de massa.

Análise do INF-α2b por EM

Inicialmente, para estabelecer a metodologia, foram usados padrões de INF-α2b da FE e de SAH (Sigma) hidrolisados pela tripsina. Apesar dos picos coletados na CLAE-FR apresentarem pureza adequada, um padrão de SAH também foi preparado para EM (resultados não apresentados). O objetivo desse experimento foi determinar se havia uma contaminação por SAH que não tivesse sido detectada no SDS-PAGE.

Na Tabela são dadas as sequências esperadas de aminoácidos dos peptídeos dessa digestão e as correspondentes massas monoisotópicas $[M + H]^+$, as teóricas e as observadas, de cada peptídeo, tanto para o padrão da FE quanto para a fração coletada de CLAE-FR.

Nessas condições, a cobertura de sequência observada para o padrão de INF-α2b foi de 72,7%. Foram observados peptídeos correspondentes a 120 do total de 165 aminoácidos no INF-α2b.

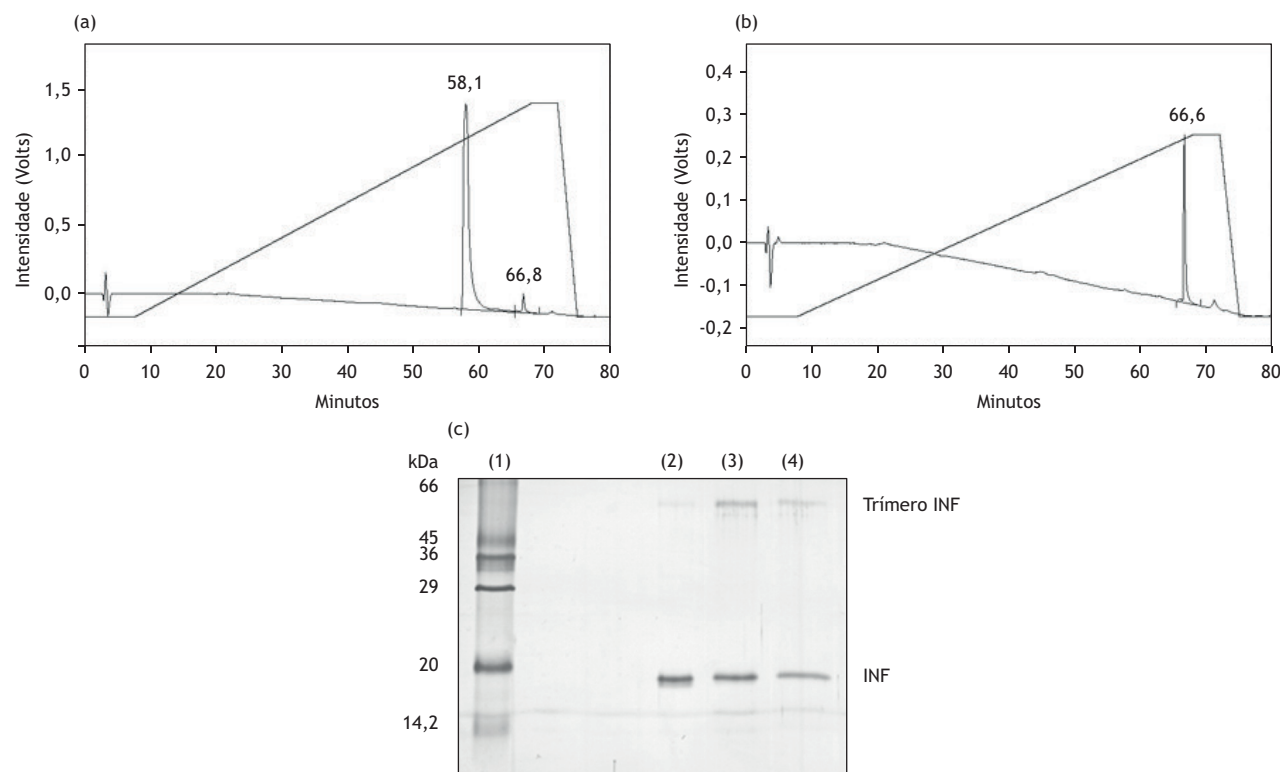


Figura 1. (a) Cromatograma da formulação de INF- α 2b; (b) Cromatograma do padrão de INF- α 2b FE. Experimentos realizados nas mesmas condições: 100 μ L de solução, 35 μ g/100 μ L, coluna ACE 3 C18-300, 250 mm C x 4,6 mm diâmetro, fase móvel A: TFA 0.1% em água, fase móvel B: acetonitrila: TFA 0.1%, com gradiente, fluxo de 1.0 mL/min, λ 214 nm. A linha sobreposta mostra a concentração de fase B; (c) Análise de SDS-PAGE das frações coletadas da CLAE-FR em (a): (1) padrão de peso molecular; linhas (2), (3), e (4) frações coletadas de CLAE-FR, com tempo de retenção de 66 min.

Tabela. Sequências esperadas de aminoácidos dos peptídeos para a hidrólise triptica de INF- α 2b e as correspondentes massas monoisotópicas $[M + H]^+$. A coluna das massas experimentais se refere aos valores observados nos espectros do padrão de INF- α 2b da FE e da fração coletada.

N ¹	Posição	Sequência de aa dos peptídeos	$[M + H]^+$ (Da) ²				
			Teórica	P ⁴	Ir ³ (%)	FC ⁵	Ir ³ (%)
1	84-112	FYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMK	3902,6	n.o. ⁶	-	n.o.	-
2	50-70	AETIPVLHEMIQIIFNLFSTK	2459,3	2459,2	4,5	n.o.	-
3	34-51	HDFGFPPQEEFGNQFQKDR	-	2225,9	98,3	2225,9	100,0
4	34-49	HDFGFPPQEEFGNQFQK	1954,8	1954,8	87,4	1954,8	33,7
5	150-162	SFSLSTNLQESLR	1481,7	1481,7	100	1481,7	71,4
6	71-83	DSSAAWDETLDDK	1450,6	1450,6	6,2	n.o.	-
7	1-12	CDLPQTHSLGSR	1313,6	1313,6	38,3	n.o.	-
8	135-144	YSPCAWEVVR	1209,5	1209,1 + 2116,9	51,4	1209 + 2116,3	44,9
9	14-22	TLMLLAQMR	1076,5	1076,5	81,5	1076,7	26,8
10	24-31	ISLFCLK	910,5	910,6 + 2116,9	26,5	910,6 + 2116,3	14,3
11	113-120	EDSILAVR	902,4	902,6	9,5	901,9	19,5
12	126-131	ITLYLK	750,4	750,7	4,4	n.o.	-
13	145-149	AEIMR	619,3	n.o.	-	n.o.	-
14	122-125	YFQR	613,3	n.o.	-	n.o.	-

1N: Número do peptídeo; 2 $[M + H]^+$ -Teórica (MH⁺): obtida submetendo-se a sequência do INF- α 2b à ferramenta *PeptideMass* (www.expasy.org); 3Ir: intensidade relativa; 4 P: padrão FE; 5 FC: Massa observada na hidrólise da fração coletada; 6n.o.: não observado.

Considerando que, devido à especificidade hidrolítica da tripsina, com a formação de aminoácidos livres e di/tripeptídeos que não são detectáveis nessas condições, o total de aminoácidos que poderíamos detectar com esse método é de 154, uma cobertura de 78% foi atingida, que é uma cobertura bastante elevada²⁰.

Observações importantes podem ser feitas a partir dos resultados do padrão da FE. De acordo com a Tabela, os peptídeos 3 e 5

têm características em suas sequências que são correlacionadas ao aumento da ionização³⁵. Ambos têm arginina no C terminal, sendo que o peptídeo 3 tem também histidina no N terminal. É importante destacar que o peptídeo 5 é o que apresenta o sinal mais intenso em espectros de massa já publicados do INF- α 2b^{20,36}.

Por outro lado, os peptídeos menos intensos têm características em suas sequências que reduzem a ionização³⁵. Quanto ao



C terminal, o peptídeo 6 tem lisina, o peptídeo 7 tem arginina, além de cisteína no N terminal. Ambos possuem aspartatos como resíduos internos, sendo que 6 tem também um triptofano.

As pontes dissulfeto, ligações importantes para a estabilidade da estrutura tridimensional de proteínas, apresentam-se de forma correta, de acordo com os resultados. Outro ponto que foi observado nos espectros das amostras foi a conservação da ponte dissulfeto entre as cisteínas 29 e 138 ($[M + H]^+$ 2117,5), demonstrando que essa característica importante da estrutura do INF- α 2b está preservada no produto comercial analisado após as manipulações nos procedimentos realizados. Foi observado um pico intenso com MH^+ de 2116,9. Esse valor corresponde à associação, via ponte dissulfeto, dos peptídeos 8 e 10. Como não foi utilizado redutor na preparação da amostra, parte da ponte de sulfeto se manteve e parte foi reduzida, formando os peptídeos 8 e 10.

Um pico intenso, com $[M + H]^+$ igual a 2225,9, foi observado (peptídeo 3). Esse valor corresponde à massa de um peptídeo onde não ocorre hidrólise pela tripsina na sequência KDR. A perda desse sítio de hidrólise pela tripsina já foi observada anteriormente na análise do INF- α 2b²⁰.

Houve uma coincidência dos peptídeos não observados com resultados preliminares da literatura, para a análise de INF- α 2b matéria-prima²⁰ e em análise do padrão da FE³⁶.

A próxima etapa foi a análise do INF- α 2b presente nas formulações. O material coletado na CLAE-FR foi então submetido à hidrólise por tripsina e os peptídeos resultantes foram analisados por EM.

Os peptídeos 2, 6 e 12, menos intensos no espectro padrão, não foram observados nos espectros das amostras. Da mesma forma, o peptídeo 7 não foi observado nas amostras.

A cobertura de sequência atingida com essa análise para as amostras das formulações farmacêuticas foi de 34,5%, sendo identificados 57 aminoácidos em um total de 165. Partindo-se da possibilidade de detecção de 154 aminoácidos, chegou-se a 37% de cobertura de sequência²⁰.

Os peptídeos mais intensos observados no padrão, 3, 4, 5, 8, 9 e 10 também foram observados na amostra preparada a partir da hidrólise da coleta da fase reversa. A cobertura de sequência alcançada com a 45,5%, sendo identificados 75 aminoácidos em 165. Partindo da possibilidade de detecção de 154 aminoácidos, chegaríamos a 48,7% de cobertura.

Outro ponto que foi observado nos espectros das amostras foi a conservação da ponte dissulfeto entre as cisteínas 29 e 138 ($[M + H]^+$ 2117,5), demonstrando que essa característica importante da estrutura do INF- α 2b está preservada no produto comercial analisado após as manipulações nos procedimentos realizados.

Avaliação da estrutura molecular do INF- α 2b

Para que pudessemos avaliar a estrutura molecular do INF- α 2b foi necessário desenvolver um método de separação SAH/INF- α 2b

não desnaturante. A CLAE-FR é considerada uma técnica desnaturante, com pH ácido e alta concentração de solvente orgânico, que muda a estrutura tridimensional durante a análise³⁷. A técnica inicialmente testada para a separação foi a CLAE-FG. Esse tipo de cromatografia demonstrou ser adequada, devido à diferença de volume hidrodinâmico entre o INF e a SAH, que, em princípio, possibilitaria a separação. Além disso, a análise se dá em condições pouco desnaturantes, com baixa concentração de solvente orgânico e pH próximo à neutralidade, o que minimiza a possibilidade de degradação do biofármaco durante o processo. O material coletado estaria nas condições adequadas para os experimentos de dicroísmo circular e fluorescência³³.

CLAE-FG

A CLAE-FG é um método amplamente usado para análise de agregados em proteínas, sendo que vários parâmetros, como a coluna cromatográfica, concentração salina da fase móvel, uso de surfactante e modificadores orgânicos, podem ser otimizados para melhorar a separação^{38,39}. Vários parâmetros foram testados para obter uma melhor separação do INF- α 2b da SAH, (resultados não mostrados). A melhor condição foi alcançada a partir da adição de 5% de n-propanol à fase móvel, com a função de diminuir as interações hidrofóbicas da formulação com a matriz que compõe a fase estacionária^{38,39}.

Nessas condições foi observada a maior diferença de tempo de retenção obtido até então entre o pico de SAH, presente em excesso, e o pico do INF- α 2b, sendo em torno de seis minutos, conforme pode ser visto na Figura 2(a). Por esse motivo o segundo pico foi coletado, concentrado e analisado por SDS-PAGE, para avaliar a homogeneidade proteica.

O resultado do SDS-PAGE é mostrado na Figura 2(b). As frações coletadas apresentaram bandas correspondentes às massas moleculares da SAH e do INF- α 2b, demonstrando que a separação efetivamente não foi completa.

Apesar da separação obtida na CLAE-FG, o resultado do SDS-PAGE da fração correspondente ao INF- α 2b ainda apresentou contaminação por SAH. A dificuldade de melhorar a separação entre as duas proteínas poderia estar associada à pequena resolução atingida pela CLAE-FG e pela grande diferença de concentração entre ambas. Por isso optou-se por um processo que reduz a concentração de SAH nas amostras. Com menos SAH, a saturação dos sítios da coluna seria menor e a separação provavelmente melhor.

Uso de membrana de imunoafinidade para remoção de SAH das amostras

A submissão da formulação ao procedimento de imunoafinidade foi acompanhada por SDS-PAGE, conforme mostrado na Figura 3. Pode-se observar que o tratamento com a resina reduziu bastante a presença de SAH nas amostras, porém não eliminou completamente essa proteína. Provavelmente o grande excesso molar da SAH saturou completamente a resina, sendo que parte dessa proteína foi eluída junto com o INF- α 2b.

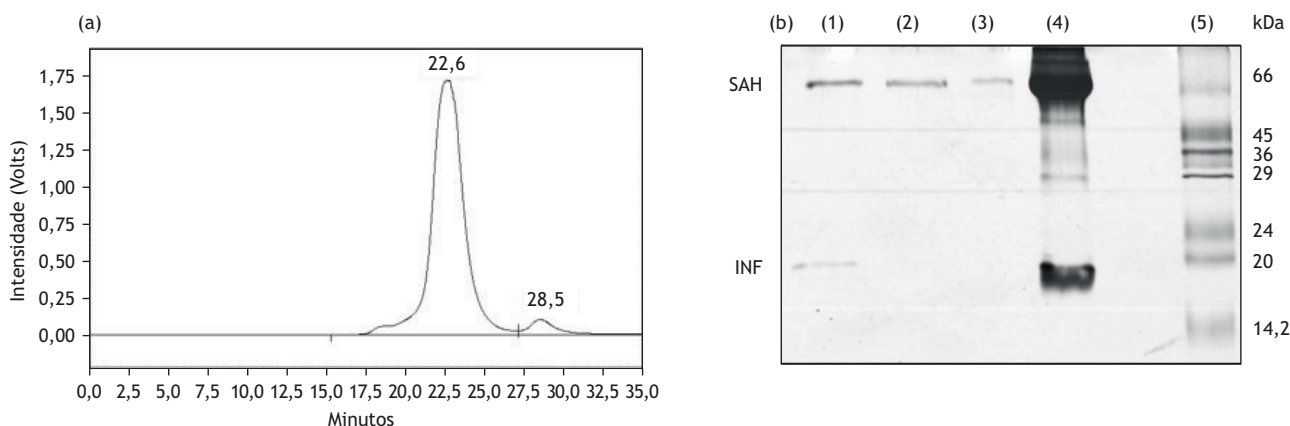


Figura 2. (a) Cromatograma da formulação de INF- α 2b obtido. Condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm diâmetro, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, 5% propanol, fluxo: 0,4 mL/min, λ 214 nm. (b) Análise por SDS-PAGE de frações coletadas, oriundas dos três sistemas testados, (1) Fração de 28 min, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, nPrOH 5%, (2) Fração de 28 min, fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, NaCl 150 mM, (3) fase móvel: tampão, PB 50 mM pH 7,0, (4) formulação, (5) padrão marcador de peso molecular.

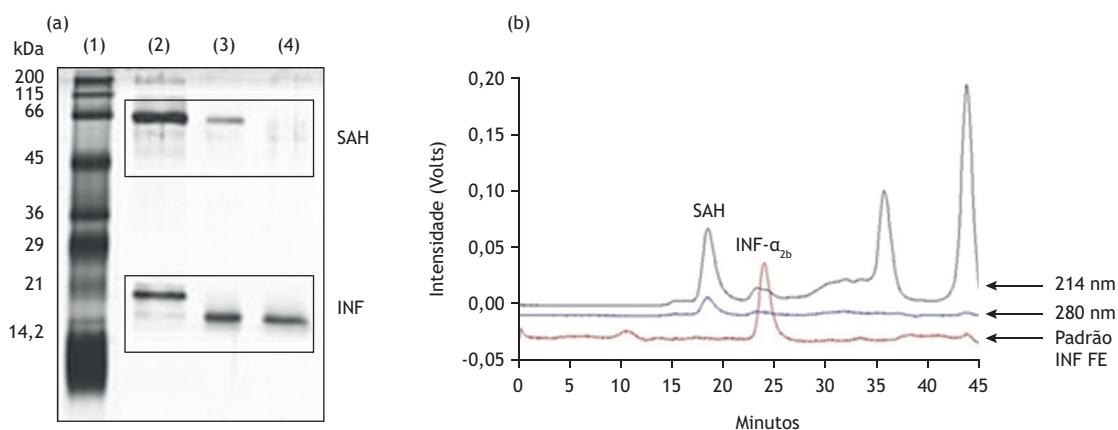


Figura 3. (a) Análise de SDS-PAGE de frações da formulação de INF- α 2b (1) padrão de massa molecular; (2) Formulação submetida à imunoafinidade (3) Fração correspondente ao pico de 28 min coletada de coluna Superdex 75 (4) Fração da coleta de coluna Superdex 75, a partir da injeção da amostra obtida por imunoafinidade; (b) Perfil cromatográfico da fração coletada da membrana de imunoafinidade, e padrão de INF FE (vermelho), condições: coluna Superdex® 75 HR 10/30, 30 cm C x 10,0 mm diâmetro, fase móvel: tampão, PB, 50 mM, NaCl 150 mM, 5% propanol pH 6,9, fluxo: 0,4 mL/min, detector UV λ , 214 nm.

A partir desse resultado, foi feita a combinação dos procedimentos de imunoafinidade e CLAE-FG, o que possibilitou a obtenção do INF- α 2b puro a partir das formulações. As amostras preparadas dessa forma apresentaram homogeneidade proteica por SDS-PAGE, como pode ser visto na Figura 3(a).

Dicroísmo circular

O efeito farmacológico de biofármacos depende da integridade de sua estrutura molecular. A degradação física, como perda da estrutura secundária e terciária, compromete a capacidade de ligação do INF- α 2b ao receptor, comprometendo o seu efeito^{15,16,17}. Portanto, se fez necessária a avaliação dessa integridade, sendo que as técnicas de dicroísmo circular e fluorescência podem ser empregadas para esse fim⁴⁰.

As frações coletadas do esquema de purificação imunoafinidade/gel filtração foram então analisadas por dicroísmo circular, sendo os resultados mostrados na Figura 4. O perfil do padrão foi semelhante ao descrito por outros autores para o INF- α 2b em pH 7,4^{31,32,41}. Aparecem bandas em 209 nm (-12,81) e 219,4 nm (-11,56), com intensidade menor. Esse perfil é característico de proteínas que apresentam alfa hélices³⁰, como é o caso do INF- α 2b⁴¹.

A fração coletada mostrou um perfil distinto do padrão. A intensidade do desvio da luz diminuiu, houve um desvio das bandas negativas para comprimentos de onda maiores, respectivamente 209,8 nm e 225,6 nm. Além disso, houve uma inversão da intensidade das bandas, sendo que a segunda banda (-11,11) foi mais intensa que a primeira (-7,87) (Figura 4).



Esses resultados indicam que há uma perda de estrutura secundária do INF- α 2b presente nas formulações. Para complementar esses dados, as amostras também foram avaliadas por fluorescência.

Fluorescência

Inicialmente, os espectros da fração coletada e do padrão da FE foram comparados, conforme a Figura 5. O padrão apresentou um espectro com máximos de emissão em 336 nm (λ_{ex} 280 nm) e 333 nm (λ_{ex} 295 nm). As frações coletadas apresentaram máximos de emissão em 338 nm (λ_{ex} 280 nm) e 334 nm (λ_{ex} 295 nm). Esses resultados demonstraram que o INF- α 2b presente nas formulações

tem uma exposição das cadeias laterais maior que o padrão da FE, indicando a possibilidade de desnaturação da estrutura terciária³¹.

Outra informação importante que os espectros de fluorescência fornecem é a medida da intensidade da luz no λ_{ex} . Essa medida é proporcional ao espalhamento de luz, fenômeno que ocorre devido à presença de agregados em solução. O padrão teve uma intensidade de 674,8 (λ_{ex} 280 nm) e 280,6 (λ_{ex} 295 nm). Nos dois comprimentos as frações coletadas apresentaram uma intensidade de 1015,6 que está na faixa de saturação do detector do fluorímetro. Esse resultado demonstra que a agregação das amostras é elevada, o que não é observado no padrão.

Os resultados da avaliação da estrutura tridimensional demonstraram que nas amostras houve desnaturação dessa estrutura.

De acordo com estudos apresentados por Qian³⁷, a complexidade da estrutura proteica e as várias vias de agregação e degradação podem ser induzidas por alguns fatores. O presente estudo constatou a degradação física causada provavelmente pelos procedimentos usados para obtenção do INF- α 2b purificado, tais como mudança de temperatura, aumento da concentração de sal na composição do tampão e as várias etapas necessárias para obter volume suficiente para análise^{16,38}.

CONCLUSÕES

Nesse estudo a separação do INF- α 2b da SAH presente nas formulações foi realizada com método de CLAE-FR, resultando em uma excelente separação da SAH e possibilitando a análise por MALDI-TOF. A análise por MALDI-TOF do INF- α 2b permitiu atingir 45,5% de cobertura da sequência do biofármaco em formulações farmacêuticas.

Para que fosse avaliada a integridade da estrutura tridimensional do biofármaco foi necessário desenvolver um protocolo de separação do INF- α 2b dos demais componentes da formulação comercial, reduzindo-se inicialmente a SAH com um procedimento de imunoafinidade e completando a purificação com CLAE-FG e

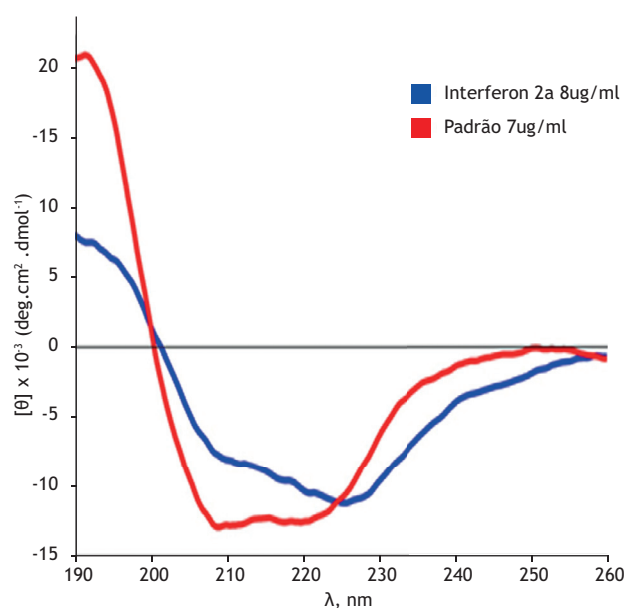


Figura 4. Espectros de dicroísmo circular do padrão de INF- α 2a da FE (7 μ g/mL) em vermelho, e da fração coletada da Imunoafinidade/CLAE-FG (8 μ g/mL) em azul. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.

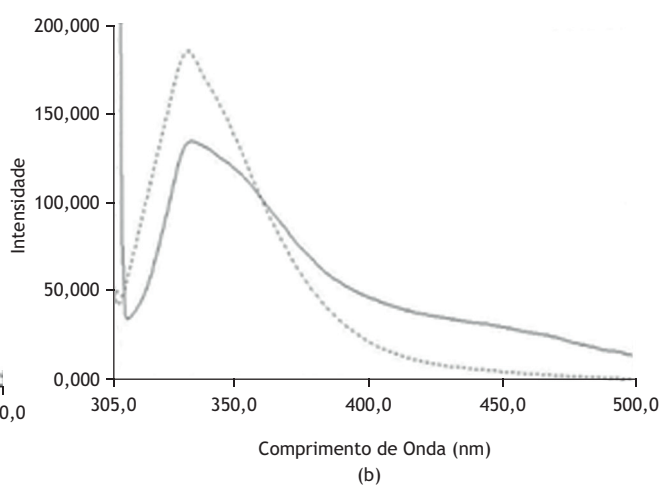
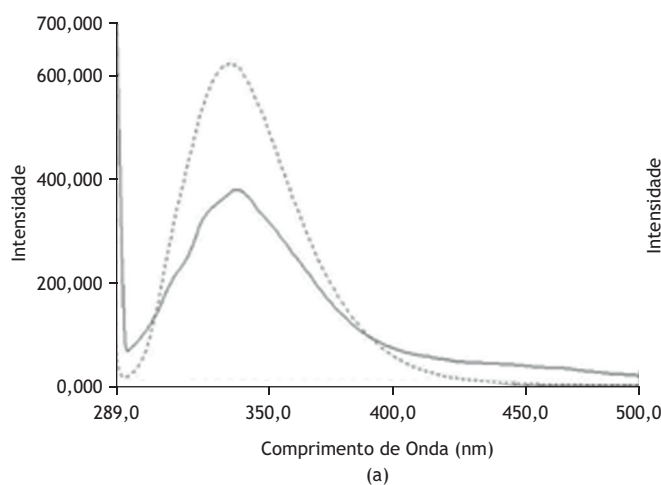


Figura 5. (a) Perfil de fluorescência do padrão de INF- α 2b da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 280 nm. (b) Perfil de fluorescência do padrão de INF- α 2b da FE (traço pontilhado) e da fração coletada da CLAE-FG (traço normal). Excitação em 295 nm. Amostras em tampão PB 10 mM, pH 7,4.



SDS-PAGE. As frações obtidas foram analisadas por dicroísmo circular e fluorescência, o que permitiu a constatação da degradação da estrutura tridimensional.

Esse estudo forneceu dados importantes que subsidiam o estabelecimento de um protocolo para a análise de INF- α 2b em produto final, que poderá substituir o mapa de peptídeos tradicional por cromatografia líquida, com a vantagem de fornecer um maior número de informações sobre a estrutura molecular do biofármaco.

A implementação da análise por MALDI-TOF na rotina é cara, principalmente devido ao custo de aquisição do equipamento. Isso poderia ser uma restrição à adoção desse método em compêndios oficiais. Por outro lado, do ponto de vista sanitário, o maior conhecimento sobre o produto é importante, pois ajuda a garantir sua efetividade e reduzir o risco em seu uso. Além disso, o alto valor agregado do INF- α 2b e seu uso crônico justificam a adoção de técnicas como o MALDI-TOF.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Hepatitis B: fact sheet. 2016[acesso 2016 Dec 5]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Ministério da Saúde (BR). Protocolo clínico e diretrizes da hepatite viral crônica b e coinfeções. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011.
3. Pestka, S. The Interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn [Review]. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20047-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700004200>
4. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004;202(1):8-32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
5. Sen GS. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*. 2001; 55(1):255-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.255>
6. Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):559-68. <https://doi.org/10.1038/nri2314>
7. Walsh G. Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology. 2nd ed. London: Wiley; 2003.
8. Närhi M, Nordström K. Manufacturing, regulatory and commercial challenges of biopharmaceuticals production: a Finnish perspective. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59(3):397-405. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.11.006>
9. Ruiz L, Reyes N, Duany L, Franco A, Aroche K, Hardy Rando E. Long-term stabilization of recombinant human interferon alpha 2b in aqueous solution without serum albumin. *Int J Pharm*. 2003;264(1-2):57-72. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00388-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00388-0)
10. Ruiz L, Aroche K, Reyes N. Aggregation of recombinant human interferon alpha 2b in solution: technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(4):99. <https://doi.org/10.1208/pt070499>
11. European Pharmacopoeia 8.0. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
12. World Health Organization. WHO Expert Committee on biological standardization: thirty-eighth report. Geneva: World Health Organization; 1988. (World Health Organ Tech Rep Series, 771). Requirements for human interferon made by recombinant DNA techniques, p. 33
13. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010.
14. United States Pharmacopeia. 39nd ed. Rockville: United States Pharmacopeia; 2016.
15. Gilg D, Riedl B, Zier A, Zimmermann MF. Analytical methods for the characterization and quality control of pharmaceutical peptides and proteins, using erythropoietin as an example. *Pharm Acta Helv*. 1996;71(6):383-94. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(96\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(96)00048-9)
16. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res*. 2004;21(6):897-903. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000029275.41323.a6>
17. Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR, Berkowitz SA, Houde D. Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2010;21(3):323-37. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.10.013>
18. Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/ biological products. In: United States Pharmacopoeia. 33 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia; 2010.
19. In: European Pharmacopoeia 8.0. v. 2. Strasbourg: Council of Europe; 2015. Interferon alfa-2 concentrated solution, p. 2150-3.
20. Tsarbopoulos A, Karas M, Strupat K, Pramanik BN, Nagabhushan TL, Hillenkamp F. Comparative mapping of recombinant proteins and glycoproteins by plasma desorption and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 1994;66(13):2062-70. <https://doi.org/10.1021/ac00085a022>
21. Simpson RJ. Proteins and proteomics: a laboratory manual. New York: Cold Spring Laboratory; 2003.
22. Zhou GH, Luo GA, Cao YC, Zhu MS, Zhu MS. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol*. 1999;5(3):235-40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v5.i3.235>
23. Bruker. User guide to the Flex III, Maldi-TOF Mass Spectrometers. Bremen: Analytical Systems; 1995. p. 1.12-4.
24. Stulík K, Pacáková V, Tichá M. Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. *J Biochem Biophys Methods*. 2003;56(1-3):1-13. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00053-8)



25. Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.015>
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Natur*. 1970;227(5259):680-5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
28. Kamp RM, Choll-Papadopoulou T, Wittmann-Liebold B, editors. *Protein structure analysis: preparation, characterization, and microsequencing*. Berlin: Springer; 1997.
29. Greenough C, Jenkins RE, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Park BK, Pennington SR. A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. *Proteomics*. 2004;4(10):3107-11. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300815>
30. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(2):119-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
31. Kim HH, Lee YM, Suh JK, Song NW. Photodegradation mechanism and reaction kinetics of recombinant human interferon-alpha2a. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(2):171-80. <https://doi.org/10.1039/B614971E>
32. Sharma VK, Kalonia DS. Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability. *Pharm Res*. 2003;20(11):1721-9. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000003367.62900.0f>
33. Silva MMCG, Lamarre B, Cerasoli E, Rakowska P, Hills A, Bailey MJA et al. Physicochemical and biological assays for quality control of biopharmaceuticals: Interferon alfa-2 case study. *Biologicals*. 2008;36(6):383-92. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.06.003>
34. Hermeling S, Schellekens H, Maas C, Gebbink MF, Crommelin DJ, Jiskoot W. Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J Pharm Sci*. 2006;95(5):1084-96. <https://doi.org/10.1002/jps.20599>
35. Yang D, Ramkissoon K, Hamlett E, Giddings MC. High-accuracy peptide mass fingerprinting using peak intensity data with machine learning. *J Proteome Res*. 2008;7(1):62-9. <https://doi.org/10.1021/pr070088g>
36. Cindrić M, Galić N, Vuletić M, Klarić M, Drevenkar V. Evaluation of recombinant human interferon alpha-2b structure and stability by in-gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40(3):781-7. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.10.024>
37. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 2010;27(4):544-75. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
38. Qian J, Tang Q, Cronin B, Markovich R, Rustum A. Development of a high performance size exclusion chromatography method to determine the stability of Human Serum Albumin in a lyophilized formulation of Interferon alfa-2b. *J Chromatogr A*. 2008;1194(1):48-56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.04>
39. Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 2010;99(4):1674-92. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>
40. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *Int J Pharm*. 2005;289(1-2):1-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
41. Johnston MJW, Nemr K, Hefford MA. Influence of bovine serum albumin on the secondary structure of interferon alpha 2b as determined by far UV circular dichroism spectropolarimetry. *Biologicals*. 2010;38(2):314-20. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.010>

Agradecimentos

Os autores agradecem ao INCQS/Fiocruz pela motivação em desenvolver este estudo, à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC/RJ) por disponibilizar o equipamento espectrômetro de massa MALDI TOF, à orientação da Dra. Cássia Ribeiro Ponciano (PUC/RJ) pela sua importante contribuição ao presente estudo, e a Celso Romero, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), por sua ajuda com a parte experimental, assim como pela análise dos resultados.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.