

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DETERMINAÇÃO DE POTÊNCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE
FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA E TIREOTROFINA: COMPARAÇÃO
ENTRE A QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE
REVERSA E POR BIOENSAIO *IN VIVO***

BEATRIZ ELANE DE ALMEIDA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Teresa C. P. Ribela

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

SÃO PAULO
2013

*Aos meus pais Ercilia e Pedro, ao meu
noivo Emerson, aos seus pais Geni e José e a
toda minha família e amigos, pelo constante amor e
apoio. Em especial aos meus afilhados Karina e
Luan, pela doçura de seus olhares.*

Agradecimentos

A Deus, por Seu amor incondicional.

À Dra. Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pela orientação e confiança, mais uma vez o meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. Paolo Bartolini, pela atenção e contribuição neste trabalho.

Ao amigo Johnny, por todo ensinamento e companheirismo.

À Dra. Cibele N. Peroni, Dra. Kayo Okazaki e Dr. Carlos R. J. Soares, pelo incentivo e colaboração.

Às amigas, Arlete, Cláudia, Dani, Ednéia, Eliana, Eliza, Fernanda, Flávia, Geiza, Gi, Giuliana, Ivete, Juliana, Karina, Keli, Larissa, Marina, Mariana, Márcia, Miriam, Natália, Neide, Patrícia, Regina, Renata, Rosa, Rosângela, Rute, Susana, Taís, Thais, e Tamara, pelo incentivo, ajuda e pelas boas risadas. Valeu meninas!

Aos amigos, Bruno, Flávio, Herbert, José Maria, Junqueira, Marcos, Nélio, Perez, Roberto, Rodrigo, Patrick, Vicent companheiros sempre prontos a ajudar.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia, que direta e/ou indiretamente contribuíram para elaboração deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar este trabalho e pelo apoio financeiro.

***“ Viver é como andar de bicicleta:
É preciso estar em constante
movimento para manter
o equilíbrio.”***

(Albert Einstein)

DETERMINAÇÃO DE POTÊNCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE FOLICULOTROFINA, LUTEOTROFINA E TIREOTROFINA: COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM FASE REVERSA E POR BIOENSAIO *IN VIVO*

Beatriz Elane de Almeida

RESUMO

Com a intenção de estabelecer métodos físico-químicos como uma alternativa ao bioensaio *in vivo* para determinação de atividade biológica, o conteúdo de hFSH, hTSH e hLH de diferentes preparações, nativas e recombinantes, foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e comparado ao dado obtido pelo clássico bioensaio *in vivo* em camundongos ou ratos (BA). Para estes hormônios foi encontrada uma relação linear entre os dois métodos: hFSH $BA_{UI} = 0,9925 RP-HPLC_{UI} - 1,3165$, $r = 0,9371$, $p < 0,001$, $n = 24$; hTSH $BA_{\mu g} = 0,9790 RP-HPLC_{\mu g} - 0,052$, $r = 0,8725$, $p < 0,001$, $n = 14$; hLH $BA_{UI} = 0,8771 RP-HPLC_{UI} + 12,41$; $r = 0,9786$, $p < 0,01$, $n = 5$. Para outras nove preparações de hFSH e onze preparações de hTSH foi determinada a diferença média (\bar{d}) entre a bioatividade predita pela RP-HPLC através destas equações e da média das bioatividades obtidas com os dois métodos. Para o hLH não foi possível determinar esta diferença em virtude das poucas amostras disponíveis. No caso do hFSH, $\bar{d} \pm DP = -2,11 \pm 3,49$ % sendo a precisão de 1,16% e no caso do hTSH, $\bar{d} \pm DP = -2,01 \pm 5,56$ % com precisão de 1,68%. Amostras parcialmente alteradas apresentaram diferentes graus de atividade de hFSH, hTSH e hLH que puderam ser preditas por RP-HPLC com uma aceitável concordância com os bioensaios *in vivo*. Estes resultados demonstraram que o emprego de um ensaio físico-químico sem o uso de animais, tal como a RP-HPLC, é uma alternativa viável ao uso do bioensaio *in vivo* para a determinação da potência de hFSH e hTSH, reduzindo assim o número de animais em geral utilizados para assegurar a qualidade e eficácia de um produto farmacêutico.

**POTENCY DETERMINATION OF FOLLITROPIN, LUTROPIN AND
THYROTROPIN: A COMPARISON BETWEEN THE QUANTIFICATION BY
REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
AND IN VIVO BIOASSAY**

Beatriz Elane de Almeida

ABSTRACT

With the intention of setting up physico-chemical methods as an alternative to *in vivo* bioassay for determining biological activity, the hFSH, hTSH and hLH content of native and recombinant preparations was determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and compared with the data obtained by the classical mouse or rat *in vivo* bioassays (BA). A linear relationship between the two methods was found for these hormones: hFSH $BA_{IU} = 0.9925 RP-HPLC_{IU} - 1.3165$, $r = 0.9371$, $p < 0.001$, $n = 24$; hTSH $BA_{\mu g} = 0.9790 RP-HPLC_{\mu g} - 0.052$, $r = 0.8725$, $p < 0.001$, $n = 14$; hLH $BA_{IU} = 0.8771 RP-HPLC_{IU} + 12.41$, $r = 0.9786$, $p < 0.01$, $n = 5$. For nine other hFSH and eleven hTSH preparations, the mean difference (\bar{d}) between the bioactivity predicted from RP-HPLC data via these equations and the mean of the bioactivities obtained with the two methods was as follows. For hLH this difference could not be estimated due to lack of different samples. In the case of hFSH, $\bar{d} \pm SD = -2.11 \pm 3.49\%$ with a precision of 1.16% and in the case of hTSH, $\bar{d} \pm SD = -2.01 \pm 5.56\%$, with precision of 1.68%. Partly-degraded hFSH, hTSH and hLH samples presented different activity degrees that could be predicted by RP-HPLC, with an acceptable agreement with the *in vivo* bioassays. These results demonstrate that the employment of a non-animal physico-chemical assay, such as RP-HPLC, is a viable alternative to the use of an *in vivo* bioassay for hFSH and hTSH potency determination, thus reducing the number of animals currently used for assuring quality and efficacy of a pharmaceutical product.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 <i>Material.....</i>	27
3.1.1 <i>Preparações hormonais.....</i>	27
3.1.2 <i>Preparações hormonais potencialmente alteradas.....</i>	28
3.1.3 <i>Animais.....</i>	28
3.1.4 <i>Reagentes.....</i>	29
3.1.5 <i>Equipamentos e acessórios principais.....</i>	29
3.2 <i>Métodos.....</i>	31
3.2.1 <i>Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....</i>	31
3.2.2 <i>HPLC de exclusão molecular (HPSEC).....</i>	32
3.2.3 <i>Ensaio biológico.....</i>	33
3.2.3.a <i>Ensaio biológico de preparações de hFSH.....</i>	33
3.2.3.b <i>Ensaio biológico de preparações de hTSH.....</i>	33
3.2.3.c <i>Ensaio biológico de preparações de hLH.....</i>	34
3.3 <i>Método Estatístico aplicado para validar a comparação entre dois métodos analíticos.....</i>	34
3.4 <i>Parâmetros de uma separação cromatográfica.....</i>	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 <i>Determinação da potência de hFSH.....</i>	37
4.1.a <i>Cromatografia Líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC).....</i>	37
4.1.b <i>Ensaio Biológico.....</i>	43
4.1.c <i>Comparação entre as quantificações de hFSH por RP-HPLC e por</i>	

<i>Ensaio Biológico in vivo</i>	44
4.1.d <i>Validação da RP-HPLC para quantificação de hFSH</i>	45
4.1.e <i>Análise das preparações potencialmente alteradas de hFSH</i>	49
4.2 <i>Determinação da potência de hTSH</i>	53
4.2.a <i>Comparação entre as determinações de hTSH por RP-HPLC e por Ensaio Biológico in vivo</i>	53
4.2.b <i>Validação da RP-HPLC para quantificação de hTSH</i>	57
4.2.c <i>Análise das preparações potencialmente alteradas de hTSH</i>	61
4.3 <i>Determinação da potência de hLH</i>	69
4.3.a <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)</i>	69
4.3.b <i>Quantificação de amostras íntegras e potencialmente alteradas por RP- HPLC e por Ensaio Biológico in vivo</i>	75
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE TABELAS

	Página
<i>TABELA 1 - Características químicas dos hormônios glicoprotéicos hFSH, hLH e hTSH (Ribela, 2006).....</i>	19
<i>TABELA 2 - Condições experimentais empregadas na RP-HPLC para análise do hFSH, hTSH e do hLH.....</i>	31
<i>TABELA 3 - Condições experimentais empregadas na HPSEC para análise do hFSH, hTSH e do hLH.....</i>	32
<i>TABELA 4 - Determinação inter-dias do conteúdo de hFSH em preparações de diferentes origens, por RP-HPLC.....</i>	39
<i>TABELA 5 - Determinação da potência do hFSH por ensaio biológico in vivo...</i>	43
<i>TABELA 6 - Comparação entre a quantificação de preparações de hFSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	44
<i>TABELA 7 - Comparação entre a atividade biológica do hFSH determinada por Bioensaio in vivo e predita pela equação por análise em RP-HPLC.....</i>	46
<i>TABELA 8 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e Altman, comparando o valor da bioatividade in vivo com aquela predita por RP- HPLC.....</i>	48
<i>TABELA 9 - Comparação entre a quantificação por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC de preparações de hFSH fora do prazo de validade.....</i>	49
<i>TABELA 10 - Comparação entre a quantificação de preparações de hTSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	54
<i>TABELA 11 - Comparação entre a atividade biológica do hTSH determinada por Bioensaio in vivo e por análise em RP-HPLC.....</i>	58
<i>TABELA 12 - Parâmetros estatísticos, determinados de acordo com Bland e</i>	

<i>Altman, comparando o valor da bioatividade in vivo com aquela predita por RP-HPLC.....</i>	<i>60</i>
<i>TABELA 13 - Comparação entre a atividade de preparações alteradas de hTSH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>63</i>
<i>TABELA 14 - Condições estudadas para análise por RP-HPLC da preparação de LH.....</i>	<i>71</i>
<i>TABELA 15 - Condições experimentais a serem empregadas na RP-HPLC para análise de hLH.....</i>	<i>72</i>
<i>TABELA 16 - Parâmetros de desempenho de separação HSA-LH em diferentes condições de RP-HPLC.....</i>	<i>74</i>
<i>TABELA 17 - Parâmetros de qualidade da separação HSA-LH.....</i>	<i>74</i>
<i>TABELA 18 - Comparação entre a quantificação de preparações de hLH íntegras e alteradas por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>75</i>
<i>TABELA 19 - Comparação entre a atividade de preparações alteradas de hLH por Bioensaio in vivo e por RP-HPLC.....</i>	<i>76</i>

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

