

DESAFIOS DA QUÍMICA ANALÍTICA FRENTE ÀS NECESSIDADES DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Alberto dos Santos Pereira, Beatriz Bicalho, Sérgio Lilla e Gilberto De Nucci*

Galeno Research Unit, Rua Latino Coelho, 1301, 13087-010, Campinas - SP

CHALLENGES OF ANALYTICAL CHEMISTRY IN FACE OF THE NEEDS OF THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY.

The development of liquid chromatography-mass spectrometric (LC-MS) techniques in the last few decades has made possible the analysis of trace amounts of analytes from complex matrices. With LC, the analytes of interest can be separated from each other as well as from the interfering matrix, after which they can be reliably identified thanks to the sensitivity and specificity of MS. LC-MS has become an irreplaceable tool for many applications, ranging from the analysis of proteins or pharmaceuticals in biological fluids to the analysis of toxic substances in environmental samples.

In different segments of Brazilian Industry mass spectrometry has an important role, e.g. in the pharmaceutical industry in the development of generic formulations, contributing to the growth of Industry and social inclusion. However, the Brazilian chemists until this moment don't have an effective role in this new segment of the analytical chemistry in Brazil.

The present paper shows the actual scenario for mass spectrometry in the pharmaceutical industry, emphasizing the need of a revision of graduation courses to attend the needs of this growing market.

Keywords: generic drugs; LC-MS; pharmaceutical industry.

INTRODUÇÃO

As últimas décadas do século XVIII foram palco de desenvolvimentos extraordinários que propiciaram o surgimento da química moderna. Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794), com a publicação de seu *Traité Elementaire de Chimie* (1789), tornou-se o principal protagonista da época de uma nova conceituação sobre como encarar os fenômenos químicos. A partir de suas concepções qualitativas e quantitativas, a investigação química rapidamente tornou-se um ofício rigorosamente científico, com linguagem e metodologia próprias¹. Entretanto, somente um século mais tarde, em meados de 1940, com o surgimento do espectrômetro UV-visível Beckman DU, houve o início da padronização das técnicas analíticas e da difusão comercial da instrumentação analítica. Antes desse equipamento, a química analítica instrumental era restrita a poucos laboratórios de pesquisa, os quais normalmente produziam seus próprios equipamentos². Nesse ínterim, a química analítica instrumental, principalmente nos campos da espectrometria e espectroscopia, evoluiu significativamente, aumentando as possibilidades analíticas em níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás.

Uma das técnicas analíticas que ganhou extrema importância no elenco disponível para a indústria farmacêutica foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

A aplicação da espectrometria de massas à análise de compostos orgânicos não é novidade. Faz mais de 70 anos desde sua primeira aplicação e mais de 30 anos desde o surgimento do primeiro sistema comercial que acoplava a espectrometria de massas à cromatografia gasosa (utilizando colunas capilares)³⁻⁵. Mesmo com o passar de tantos anos, a espectrometria de massas ainda é tratada, no Brasil, como uma ferramenta analítica praticamente restrita à pesquisa acadêmica (raras exceções), quando já há no mercado brasileiro demanda para profissionais especializados na área. A espectrometria de massas já é uma realidade nos laboratórios analíticos de diversas empresas privadas de diferentes segmentos, sobremaneira do alimentício e do farmacêutico.

As características ideais para um detector para qualquer sistema cromatográfico seriam um sistema com alta sensibilidade assim como alta seletividade, boa resposta a um grande número de classes de compostos e habilidade na detecção de misturas complexas permitindo um elevado "throughput". É também indispensável o detector poder ser utilizado em análises quantitativas. Todas essas características são encontradas no detector por espectrometria de massas^{6,7}.

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica ("APCI")⁸ e a ionização por eletronebulização ("electrospray, ESI")^{9,10} possibilitaram a união viável e efetiva de duas poderosas ferramentas analíticas, a espectrometria de massas (EM) com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tornando-as um método (CLAE-EM) robusto e aplicável a uma grande variedade de matrizes. E mais recentemente com o surgimento dos primeiros equipamentos comerciais com sistema de fotoionização¹¹, a técnica CLAE-EM tornou-se uma ferramenta analítica universal capaz de analisar desde componentes de baixa massa molecular como aminoácidos até proteínas. A Figura 1 mostra a aplicação dos diferentes tipos de sistemas de ionização existentes para CLAE-EM e as diferentes classes de substâncias passíveis de serem analisadas.

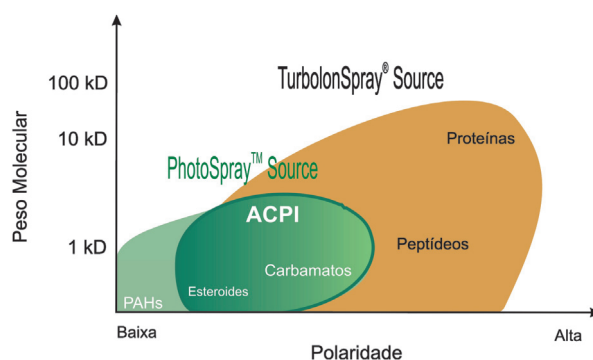


Figura 1. Distribuição de diferentes classes de substâncias frente às distintas técnicas de ionização disponíveis para a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

*e-mail: denucci@gdenucci.com

DEMANDA DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

A espectrometria de massas está fortemente presente na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de novos fármacos e formulações até o controle da qualidade. No Brasil, um segmento que vem ganhando cada vez mais importância econômica, inclusive trazendo divisas com a prestação de serviços na área de química analítica, é a análise de fármacos em amostras de plasma utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM-EM, Figura 2) para desenvolvimento de medicamentos genéricos. O impacto e a velocidade de crescimento da CLAE-EM-EM são tão grandes que, mesmo para moléculas tradicionalmente analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM), como é o caso dos esteróides¹², a CLAE-EM-EM apresenta enormes vantagens, principalmente em relação à simplicidade da preparação da amostra (na maioria dos casos não necessita a execução de uma etapa de derivatização) e tempo de análise, normalmente inferior a 5 min. Um exemplo é o caso da betametasona, cuja análise em plasma sem derivatização e após extração líquido-líquido (éter/hexano, e um volume de plasma de 0,5 mL) possui um limite de quantificação de 50 pg/mL, com tempo de análise de somente 2,5 min³. Portanto, cerca de 10 vezes mais rápido que os métodos utilizando CGAR-EM, propiciando assim um "high-throughput" (Figura 3). A seguir exemplificamos alguns filões em que a química analítica vem tendo um papel fundamental no setor privado brasileiro.

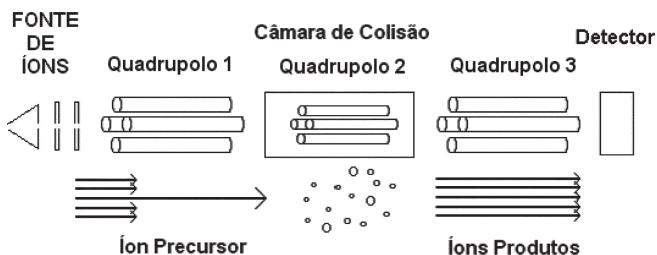


Figura 2. Esquema da espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas (sinônimos: espectrometria de massas em tandem, EM-EM e EM²). Ilustra uma das formas de realização da técnica, neste caso empregando sistema de analisadores de massas em configuração triplo quadrupolo

Programa de medicamentos genéricos no Brasil

Os genéricos são cópias de medicamentos inovadores cujas patentes já expiraram. No Brasil, a regulamentação deste tipo de medicamento deu-se em 1999, com a promulgação da Lei 9.787.

Os medicamentos genéricos fecharam o ano de 2004 com forte expansão nas vendas, consolidando a posição de segmento que mais cresce na indústria farmacêutica no país. Entre janeiro e dezembro de 2004, foram comercializadas 122,9 milhões de unidades de genéricos no mercado brasileiro (Figura 4), contra 94,8 milhões no mesmo período de 2003, perfazendo um aumento de 30% em volume. Além do aumento do consumo no mercado brasileiro, as empresas estão começando a exportar medicamentos genéricos, inclusive para a Europa. Os fabricantes de genéricos instalados no Brasil estimam investir nos próximos quatro anos US\$ 280 milhões; do total previsto em investimentos, 42% serão destinados às novas fábricas, 17% serão aplicados no aumento da capacidade produtiva, 23% nos testes necessários para que os medicamentos sejam aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e 18% destinados ao desenvolvimento de novos remédios genéricos.

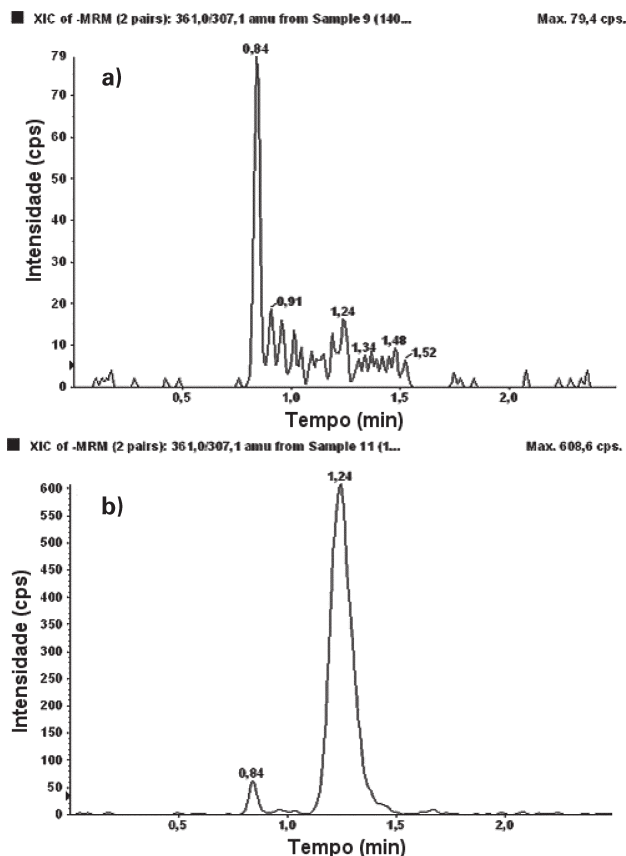


Figura 3. Análise rápida de fármaco em plasma humano: a) fragmentograma (transição m/z 361,0/m/z 307,1) de branco de plasma humano e b) fragmentograma (transição m/z 361,0/m/z 307,1) de plasma humano contendo 50 pg/mL de betametasona, evidenciada pelo pico com $t_R = 1,24$ min

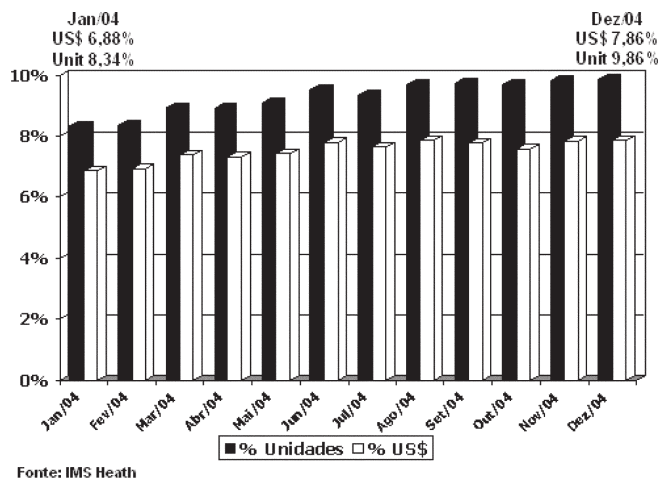


Figura 4. Evolução do mercado brasileiro de medicamentos genéricos durante o ano de 2004

Devido à necessidade de métodos analíticos cada vez mais sensíveis (capazes de analisar substâncias em amostras de plasma na ordem de ppb até ppt, em amostras com volume disponível de somente 2,0 mL) a espectrometria de massas (principalmente a CLAE-EM/EM), assim como teoricamente, o químico analítico possui, nesse segmento econômico, importância econômica cada vez maior, a de um papel de importância fundamental nas avaliações de bioequivalência.

O teste de bioequivalência comprova que o medicamento genérico e seu respectivo medicamento de referência (aquele para o qual foi efetuada pesquisa clínica para comprovar sua eficácia e segurança antes do registro) apresentam a mesma biodisponibilidade no organismo, e corresponde a um estudo comparativo entre medicamentos administrados por uma mesma via extravascular, que avalia parâmetros relacionados à absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica administrada. A bioequivalência assegura que o medicamento genérico seja um equivalente terapêutico do medicamento de referência, portanto, que apresente a mesma eficácia clínica e a mesma segurança. O medicamento genérico é considerado bioequivalente ao medicamento de referência quando se demonstra que não existe diferença estatisticamente significativa entre suas biodisponibilidades, ou seja, em relação à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção (Figura 5).

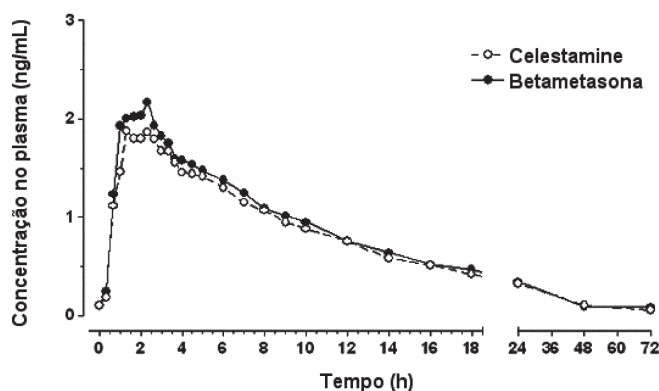


Figura 5. Exemplo da comparação da concentração plasmática de um medicamento genérico (nesse caso o princípio ativo é a betametasona) com o medicamento referência (celestamine®), após a administração de um comprimido contendo 0,25 mg de betametasona

Desenvolvimento de novos medicamentos

Diversos obstáculos devem ser enfrentados no curso do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Dentre eles, o custo de centenas de milhões de dólares de trazer um novo fármaco ao mercado é certamente limitante, principalmente por estar em grande parte relacionado à baixa eficiência dos programas de pesquisa. Quantias significativas são perdidas através de investimentos em candidatos a fármacos que não alcançam o mercado, por reprovação em estágios avançados da etapa clínica. Diante disto, as abordagens emergentes do tipo “ômica” vêm ganhando notoriedade, no sentido de que propõem estratégias inovadoras para identificar mais rapidamente os candidatos a fármaco sem potencial de sucesso, aumentando assim a eficiência das triagens clínicas e a diminuição dos custos operacionais¹⁴. Dentre elas podemos destacar a proteômica e a metabolômica, onde a espectrometria de massas novamente possui um papel fundamental.

Proteômica

É impossível estudar o comportamento dos sistemas biológicos enfocando exclusivamente o genoma, pois são as proteínas e não os genes que determinam o fenótipo de um organismo. Por ex., em resposta a um estímulo interno ou externo, ou como consequência de uma patologia, a síntese de algumas proteínas pode ser estimulada ou inibida; estas proteínas podem sofrer modificações pós-transducionais ou podem ser degradadas ou, ainda, recolocadas em diferentes locais da célula.

A proteômica estuda os processos biológicos através da análi-

se sistemática das proteínas expressas nas células ou tecidos, em consequência direta das condições externas e do estado do organismo em um determinado momento. Obter o proteoma de uma célula ou de um organismo é como fazer uma “fotografia instantânea” das proteínas expressas naquele determinado momento. Pode-se afirmar, portanto, que cada genoma, potencialmente, pode originar um número infinito de proteomas¹⁵.

O recente crescimento exponencial da proteômica é devido à grande quantidade de dados acumulados nos últimos anos sobre seqüenciamento gênico e, também, aos melhoramentos no campo da espectrometria de massas. Na ausência destas condições a identificação das proteínas seria um processo longo e laborioso.

Estudos de proteômica podem ser aplicados em inúmeras áreas como, por ex., na pesquisa médica, comparar o quadro proteico expresso de uma célula ou de um tecido afetado por uma doença com o mesmo quadro expresso em condições normais pode realçar um grande número de proteínas alteradas. A identificação e caracterização dessas proteínas alteradas possibilitam a definição de “marcadores moleculares”, que permitam o diagnóstico e o controle da progressão de uma doença.

Nos últimos anos a espectrometria de massas foi uma das técnicas mais utilizadas na análise de biomoléculas, tornando-se a principal ferramenta da proteômica técnicas de ionização “soft” como o MALDI (“matrix assisted laser desorption ionization”) ou a “nano-electrospray”, que permitem analisar peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos em nível de femtomol com grande acurácia de massa. Além disso, os avanços recentes na bioinformática permitiram o acesso e a manipulação de enormes quantidades de dados provenientes de bancos de dados de seqüências gênicas e proteicas. A partir de uma proteína incógnita, purificada e digerida com uma enzima proteolítica é possível, com uma única análise de cromatografia capilar acoplada com a espectrometria de massas, identificar inequivocamente a proteína em análise mediante comparação dos pesos moleculares e da seqüência dos peptídeos resultantes da hidrólise enzimática com aquelas presentes no banco de dados de proteínas. Usando procedimentos de bioquímica das proteínas é possível determinar, além da estrutura primária, também as eventuais modificações pós-transducionais como, por ex., fosforilação e glicosilação presentes na proteína em análise.

Uma ferramenta assim valiosa disponibiliza aos pesquisadores da área de biologia molecular uma enorme quantidade de informações detalhadas. Por ex., através da identificação das proteínas expressas e da determinação das eventuais modificações pós-transducionais, pode-se fornecer a base para estudos conformacionais de receptores necessários para compreender quais são os alvos a atingir no processo de “drug discovery”.

Estudos detalhados da estrutura primária de peptídeos e proteínas com atividade farmacológica proveniente da amostra de veneno de diversas espécies animais do Brasil, incluindo *Tityus serrulatus*, *Lonomia obliqua* e *Bothrops insularis*, foram desenvolvidos com o auxílio da espectrometria de massas Q-TOF (“Quadrupole-Time of Flight”: quadrupolo-tempo de voo)^{16,17}.

A identificação da estrutura primária das proteínas com atividade farmacológica faz parte de um trabalho mais amplo que tem como objetivo final o desenvolvimento de novos fármacos. Estes dados estão sendo utilizados como base de estudos de cristalografia por raios-X. As informações estruturais obtidas podem ser utilizadas para sintetizar moléculas “não-peptídicas”, que mimetizam a conformação de uma região específica das proteínas ativas. Estas estruturas serviriam como base para estudos de química combinatorial ou de docagem (“docking”) fármaco/receptor. Várias técnicas de espectrometria de massas têm sido usadas com esta finalidade, como por ex., a CLAE-EM-EM (Figura 6).

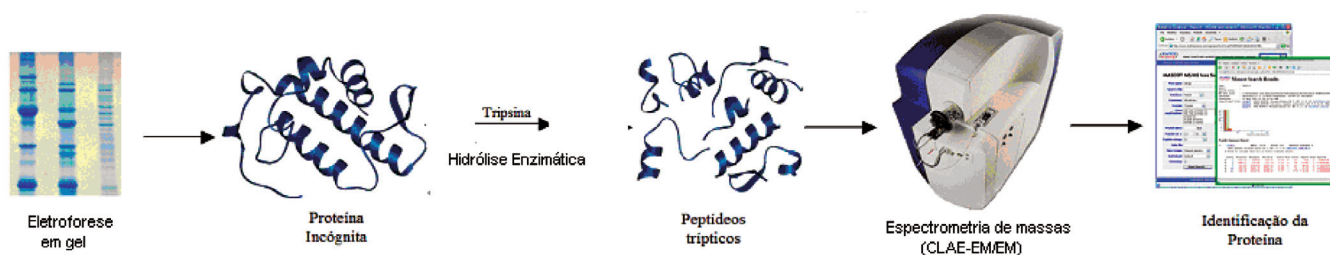


Figura 6. Esquema simplificado de um processo de caracterização de proteínas

A abordagem do tipo proteômico tem aplicação também na análise de drogas obtidas com a técnica do DNA recombinante (“Biopharmaceutical products”). A espectrometria de massas pode ser utilizada não só na fase de desenvolvimento e controle da expressão correta do princípio ativo da parte do organismo hospedeiro, mas também durante a fase de produção do remédio, no controle de eventuais proteínas residuais.

Um dos problemas no desenvolvimento e produção deste tipo de remédio pode ser ilustrado pela contaminação com componentes do sistema de expressão de proteínas provenientes do organismo hospedeiro usado durante a produção do fármaco recombinante. Portanto, para assegurar a qualidade e a segurança dos produtos, deve ser garantida a completa ausência de contaminantes como DNA celular e outras proteínas provenientes do organismo hospedeiro, durante a fase de purificação do princípio ativo.

Uma das técnicas para detectar proteínas residuais provenientes do organismo hospedeiro são os ensaios imunológicos, como Western blot ou enzima-imunoensaios (ELISA), porém uma limitação desta técnica é que determina apenas a presença de proteínas antigênicas e não detecta todos os potenciais contaminantes.

A análise mediante espectrometria de massas fornece uma alternativa para resolver este tipo de problema. O controle da pureza e a identificação de eventuais proteínas contaminantes dos princípios ativos podem ser facilmente realizados analisando-se os hidrolisados protéicos de amostras provenientes das fases de produção, como também do produto final, permitindo uma rápida identificação das proteínas contaminantes e assegurando, a nível molecular, a qualidade do princípio ativo produzido.

Metabolômica

Este termo significa o estudo global do perfil metabólico de uma dada célula, tecido, fluido, órgão ou organismo em um dado instante. De certa forma representa a bioquímica pós-genômica^{14,18}.

A metabolômica, em particular, tende a ser especialmente útil à farmacologia porque trata do delineamento do *status* bioquímico de sistemas (ex., células, tecidos) metabolicamente ativos a fim de ampliar as bases do entendimento de como as doenças se manifestam, como os xenobióticos atuam e quais substâncias endógenas estão (ou não estão) respondendo aos mesmos e em qual extensão. Resumidamente, é uma abordagem que se caracteriza pela quantificação e racionalização do fluxo do repertório de micro-moléculas inatas dos seres vivos.

Na prática, boa parte do progresso da metabolômica depende do desenvolvimento de ensaios rápidos e confiáveis para caracterização de perfis metabólicos contendo biomarcadores de determinados fenótipos. Isto requer tecnologias analíticas dedicadas à caracterização do conteúdo de amostras quimicamente complexas, sendo possível reconhecer, no presente, que a espectrometria de massas ocupa uma posição central nas principais metodologias de análise modernas.

Desenvolvimento de novas formulações de medicamentos

Para desenvolver um medicamento eficaz e seguro é preciso ter amplo conhecimento das propriedades físicas e físico-químicas do fármaco (princípio ativo) e dos excipientes (farmacologicamente inertes). Até o início da década de 60, era comum associar-se a eficácia clínica do medicamento apenas à atividade intrínseca do fármaco. Entretanto, várias evidências demonstraram que os componentes da formulação e as técnicas de fabricação também influenciam, sendo indispensável que a forma farmacêutica libere o fármaco na quantidade e na velocidade adequadas ao objetivo terapêutico do produto, o que está diretamente relacionado à sua biodisponibilidade.

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral são aquelas que, potencialmente, podem apresentar maiores problemas em relação à biodisponibilidade. Geralmente, essas formas apresentam formulações complexas e são fabricadas através de processos que envolvem várias etapas. Esses fatores muitas vezes afetam significativamente a velocidade de dissolução do fármaco, comprometendo a magnitude de sua absorção, de modo a causar um efeito direto sobre a atividade farmacológica. Deste modo, observa-se a importância dos estudos de dissolução para o desenvolvimento farmacotécnico e o controle da qualidade de medicamentos. O teste de dissolução determina a porcentagem do princípio ativo declarado no rótulo do produto, liberada no meio de dissolução em função do tempo, quando o mesmo é submetido a condições experimentais específicas.

Com a expansão do mercado de medicamentos genéricos, o teste de dissolução ganhou notoriedade, devido a sua aplicação às análises de equivalência farmacêutica, as quais compreendem testes físicos e físico-químicos utilizados para comparar duas ou mais amostras de medicamentos. Segundo a legislação brasileira, o medicamento genérico deve ser o equivalente farmacêutico ao seu respectivo medicamento de referência, ou seja, deve conter o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica.

Os principais componentes de um teste de dissolução são um banho termostatizado, com cubas de material transparente usadas para conter o meio de dissolução, e sistema de agitação provido de controle automatizado da velocidade.

Os métodos oficiais estabelecem limites mínimos para a porcentagem dissolvida em um determinado tempo. Entretanto, principalmente para o desenvolvimento farmacotécnico de um produto, tal informação é insuficiente. Nesse sentido, torna-se útil avaliar o perfil de dissolução do fármaco, ou seja, a curva da porcentagem dissolvida em função do tempo, dado essencial no caso do planejamento de formulações de liberação controlada. Tradicionalmente, os perfis de dissolução são realizados, no mínimo, com 12 exemplares ($n = 12$) do medicamento e com pelo menos 6 amostragens sucessivas do meio de dissolução.

Os testes são realizados por meio de amostragem manual ou automática, com posterior submissão da amostra coletada direta-

mente ao espectrofotômetro UV-Vis ou à CLAE acoplada a espectrofotômetro UV ou fluorescência, para determinação da concentração do analito, sendo, neste último caso, após separação do mesmo dos demais componentes da amostra.

A Farmacopéia Americana preconiza vários métodos para avaliação da dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas de liberação convencional e modificada, a maioria utilizando a CLAE-UV como principal ferramenta analítica¹⁹. Em média, os métodos demandam 15 min de máquina por análise, os quais significam cerca de 20 h de máquina para determinação de um perfil de dissolução, segundo o protocolo de amostragem mencionado acima. Caso fosse utilizada a CLAE-EM, a mesma tarefa seria executada em pelo menos 1/3 do tempo, triplicando o rendimento do trabalho em termos de estudo/máquina.

Apesar das inúmeras vantagens no que diz respeito ao tempo de análise, à sensibilidade e seletividade da CLAE-EM, relativamente à CLAE-UV, a espectrometria de massas ainda não consta oficialmente como um método de detecção nos compêndios farmacêuticos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a produção de medicamentos para exportação e substituição de importações, bem como a pesquisa de novos medicamentos e formulações, no Brasil, são atividades em forte expansão (obviamente não se compara com a dos países desenvolvidos). Os controles de matéria-prima, produto final, caracterização de biodisponibilidade, bioequivalência e de metabólitos e pesquisas de novas drogas necessitam de apoio analítico de ponta. Cada vez mais esse suporte é fornecido pelas diferentes modalidades da espectrometria de massas contemporânea.

A espectrometria de massas já é uma realidade em diversos segmentos da indústria farmacêutica brasileira, propiciando um desenvolvimento sustentável e inclusão social (por ex., a produção de remédios genéricos). Contudo, não existe um envolvimento concreto dos químicos nesse processo de substituição de práticas de

análise tradicionais por espectrometria de massas, bem como na sua popularização e disseminação.

Existe a necessidade evidente da quebra de velhos paradigmas, para que os cursos de graduação em Química possam propiciar a esse novo mercado, graduandos com formação adequada para essa área interdisciplinar em expansão, tanto na área de métodos físico-químicos de análise, quanto de aspectos ligados à farmacologia e toxicologia.

REFERÊNCIAS

1. Jaffe, B.; *Crucibles: The Story of Chemistry from Alchemy to Nuclear Fission*, 4th ed. Dover Publications, Inc.: New York, 1976, p. 368.
2. Beckman, A. O.; Gallaway, W. S.; Kaye, W.; Ulrich, W. F.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 280 A.
3. Wiley, W. C.; MacLaren, I. H.; *The Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150.
4. Holmes, J. C.; Morrell, F. A. *Appl. Spectrosc.* **1957**, *11*, 86.
5. Ryhage, R.; *Mass Spectrom. Rev.* **1993**, *12*, 1.
6. Buffington, R.; Wilson, M. K.; *Detectors for gas chromatography – A practical primer*, Hewlett-Packard Co. 1987, p. 106.
7. Dressler, M.; *Journal of Chromatography Library*, Amsterdam, V. 361986, p. 319.
8. Horning, E. C.; Horning, M. G.; Carroll, D. I.; Dzidic, I.; Stillwell, R. N.; *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 936.
9. Yamashita, M.; Fenn, J. B.; *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451.
10. Yamashita, M.; Fenn, J. B.; *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4671.
11. Robb, D. B.; Covey T. R.; Bruins, A. P.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653.
12. Pereira, H. M. G.; Marques, M. A. S.; Cardoso, J. N.; Aquino Neto, F. R.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1096.
13. Pereira, A. S.; Oliveira, L. S. O. B.; Mendes, G. D.; Gabbai, J. J., De Nucci, G. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, no prelo.
14. Ryals, J.; *Pharmatech* **2004**, 51.
15. Graves, P. R.; Haystead, T. A. J.; *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2002**, *66*, 39.
16. Damico, D. C.; Lilla, S.; De Nucci, G.; Ponce-Soto, L. A.; Winck, F. V.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; *Biochim. Biophys. Acta*, no prelo.
17. Lilla, S.; Pereira, R.; Hyslop, S.; Donato, J. L.; Le Bonniec, B. F.; De Nucci, G.; *J. Mass Spectrom.* **2005**, *816*, 321.
18. Glassbrook, N.; Beecher, C.; Ryals, J.; *Nat. Biotechnol.* **2000**, *28*, 1142.
19. *United States Pharmacopeia*, USP27-NF22, January 2004, Rockville-MD, p. 2148.